

## 日本脳炎ウイルス感染における致死的病態を誘導する脳内浸潤T細胞のマウスモデルにおける解析

著者	白井 顕治
発行年	2014
学位授与大学	筑波大学 (University of Tsukuba)
学位授与年度	2014
報告番号	12102甲第7134号
URL	<a href="http://hdl.handle.net/2241/00142056">http://hdl.handle.net/2241/00142056</a>

筑 波 大 学

博 士 （ 医 学 ） 学 位 論 文

日本脳炎ウイルス感染における致死的病態を誘導する  
脳内浸潤 T 細胞のマウスモデルにおける解析

2014

筑波大学大学院博士課程人間総合科学研究科

白井 顕治

1	<b>目次</b>	
2	1. 背景および目的 .....	3
3	2. 実験方法および材料 .....	8
4	2. 1. ウイルス .....	8
5	2. 2. ウイルス接種およびサンプル採取 .....	8
6	2. 3. 大脳組織におけるウイルス力価の定量 .....	9
7	2. 4. マウスの選択 .....	9
8	2. 5. 病理組織学的解析 .....	9
9	2. 6. 定量リアルタイム PCR 解析 .....	9
10	2. 7. TCR レパトア解析 .....	1 3
11	2. 8. CDR3 アミノ酸配列解析 .....	1 7
12	2. 9. 統計解析 .....	1 8
13	3. 結果 .....	1 9
14	3. 1. 生存群と死亡群の決定 .....	1 9
15	3. 2. 生存群と死亡群における脳内ウイルス量の比較 .....	2 1
16	3. 3. JEV 感染マウスの大脳皮質における病理解析 .....	2 3
17	3. 4. 生存群と死亡群の脳内 Th1、Th2 サイトカインバランスの比較 .....	2 5
18	3. 5. 脳内浸潤細胞と細胞障害因子マーカーの解析 .....	2 7
19	3. 6. 脳内浸潤 T 細胞の TCR レパトア解析 .....	2 9
20	3. 7. 生存群と死亡群の脳内浸潤 T 細胞の CDR3 アミノ酸配列解析 .....	3 1
21	4. 考察 .....	3 7
22	5. 結論 .....	4 4
23	参考文献 .....	4 6

24 謝辞 ..... 5 4

25

## 1. 背景および目的

日本脳炎はアジアにおいて最も重要なウイルス性脳炎といえる。東アジア、東南アジア、南アジアに広く発生が認められ、年間約 1 万人の死者が生じている[1]。我が国でも毎年日本脳炎患者の発生が報告されており、ワクチン接種が進められている感染症の一つである。

日本脳炎は日本脳炎ウイルス（JEV）を保有している蚊に刺されることにより、感染・発症するウイルス感染症である。脳炎の発症は感染者 100～1,000 人に 1 人程度と考えられているが、発症すると高熱を発し、痙攣、意識障害などの脳炎症状を呈し、致死率が約 20% の重篤な疾患である。有効な治療方法はなく、生存者の約半数は神経症状を主調とした後遺症を残し、中には脳にダメージを受け麻痺などの重篤な後遺症が残る場合もある[2]。日本においては 1960 年代中ごろまで年間 1,000 例以上あった患者数が日本脳炎ワクチンの普及により 1992 年以降には 10 例未満、近年では年間数名程度の発生にとどまっている。しかし、JEV の増幅動物である豚における感染状況を見ると、西日本を中心に毎年広い地域で抗体陽性の豚が確認されており、これは JEV 感染蚊が多数存在することを意味する。また、ワクチン接種後に重篤な急性散在性脊髄膜炎（ADEM）症例の発生から、平成 17 年に厚生労働省はワクチン接種の積極的推奨の差し控えの緊急勧告を発表した[3]。その後 3～6 歳での JEV ワクチンの接種率が激減し、その結果、ヒトの日本脳炎に対する抗体保有状況は 2008 年度の 0～6 歳群でこれまでにない低い割合となっている。こうした背景から日本脳炎は現在再流行が危惧される感染症にまでなってきている。一方、JEV 感染による日本脳炎発症のメカニズムや発症後の重症化メカニズムについては未だ十分な知見は得られて

いない。

JEV の弱毒株である JaOArS982 株を用いた感染モデルマウスでは、 $10^4 \sim 10^6$  PFU の範囲でウイルスを感染させた場合に 100% 感染が成立し、脳炎症状を呈することが知られている。感染成立以降は約 30% の致死率を示すが、 $10^4 \sim 10^6$  PFU の範囲内ではウイルス接種量と致死率に相関性がみられない。フラビウイルス感染症において、致死率はウイルス接種量と相関性を持たないことはすでに報告されているが[4-8]、病態形成や致死率にはウイルスのみではなく生体側の免疫応答が関与している可能性が示唆されている。こうした背景より、日本脳炎の病態を解明するうえで、JEV 感染モデルマウスでの予後や生存率を決定している因子を、感染免疫学的に明らかにすることは重要である。

JEV は人から人へは感染せず、一般的に蚊の吸血により経皮的にウイルスが侵入し感染する。皮膚に常在する免疫担当細胞であるランゲルハンス細胞は、JEV を取り込んだ後にリンパ管を通り、所属リンパ節まで遊走する。そして主要組織適合遺伝子複合体（MHC）を介して T 細胞に抗原提示を行うことで抗原特異的な細胞性免疫が開始される。また、T 細胞は細胞障害促進や免疫抑制作用を持つサイトカインの分泌の調節や抗体のクラススイッチに関しても中心的な役割を果たし、JEV への感染免疫として、感染制御や日本脳炎の防御において重要な役割を果たすと考えられる[5,6,8,9]。

一方で、マウスに脱髄を起こすことが知られているタイラーウイルスを用いた Lindsley らの研究では、SJL マウスにおいて CD8+T 細胞が感染 7 日目では脊髄実質に認められないものの、30 日目以降で増加し CD8+T 細胞と脱髄が相関することを言及した[10]。これは

CD8+T 細胞による細胞性免疫によって引き起こされる免疫反応が、生体にとって必ずしも防御に作用するとは限らないことを示した。JEV における T 細胞に関する先行する研究で、藤井らは JEV 強毒株である JaTh160 を C3H マウスに感染させた研究において、脳炎を起こした脳内に浸潤する T 細胞が、T 細胞受容体 (TCR)  $\alpha$  鎖可変領域 (AV) 5-1、17-1、19-1、TCR  $\beta$  鎖可変領域 (BV) 2-1、8-3、13-1 を高頻度を持つことを証明した[11]。しかし、JEV 強毒株を用いたこの研究ではこれらの TCR を持つ脳内浸潤 T 細胞と病態との関連性を結びつけるには至っていない。

また、抗原特異性 T 細胞ホメオスターシスを維持するために、制御性 T 細胞 (Treg) は、病原体に対する反応性および炎症や自己免疫性疾患を制御し、エフェクター T 細胞を抑制する機能を生体内で担っていることが報告されている[12-15]。Treg は Foxp3 を発現し、CD3+CD4+CD25+を持つ細胞と定義されている。JEV 以外のフラビウイルス属に属するウイルスであるウエストナイルウイルス感染において、末梢血中の Treg の発現量が低いと感染後に症候性となりやすい傾向があることが報告されている[16]。また、末梢レベルの解析のみでは大脳局所の免疫性状を反映するものではなく、Treg 発現レベルを局所的に調べる必要があるため[17-19]、JEV 感染脳炎時の脳内局所において Treg の発現レベルを調べることは重要である。

免疫の特異性や方向性を決定しているのは T 細胞であり、その T 細胞のアイデンティティを決定しているものは TCR である。また、ウイルス感染を最終的に収束させるもっとも重要な免疫応答は T 細胞の感染細胞に対する障害活性と考えられる。この TCR を解析す



ることにより、各個体の認識している抗原の相動性を確認することができ、これまで明らかにされなかった感染予後と T 細胞の性質の違いを見ることができる。以上のことから、JEV 感染性脳炎の宿主要因としての感染免疫を解析するためには T 細胞の解析が不可欠であると考えられる。

T 細胞の活性化を確認する手法として、リアルタイム定量逆転写ポリメラーゼ連鎖反応 (qRT-PCR) や ELISA を用いた炎症性サイトカイン (IFN- $\gamma$ 、TNF- $\alpha$ ) の測定は、mRNA および蛋白レベルでの解析としては一般的であるが、T 細胞をクローンレベルで特定することは困難である。種々の TCR に対するモノクローナル抗体を用いたフローサイトメトリー解析によって特定の T 細胞集団を確認することは実現可能であるが、全ての TCR ファミリーを網羅的に検出し評価するために必要なモノクローナル抗体は存在していない。

機能的な TCR AV および BV 遺伝子は、ゲノム上にコードされた可変 (variable; V)、多様性 (diversity; D)、結合 (joining; J)、定常 (constant; C) 遺伝子セグメントにおける体細胞遺伝子再構成によって構築され、さらに TCR の抗原特異性および多様性は、MHC 上の抗原ペプチドと直接結合する部位である相補性決定領域 3 (complementary determining region 3; CDR3) に依存し、また CDR3 は主に遺伝子再構成の間に発生するヌクレオチドの削除や挿入によって構成され、多様性を獲得する[20,21]。

共同研究を行っている独立行政法人 国立病院機構 相模原病院 臨床研究センター 診断・治療研究室では、mRNA ベースの解析法で、生体内に存在する全ての TCR の存在頻度を変化させることなく adaptor-ligation-mediated PCR (AL-PCR) によって増幅させ、TCR V

領域遺伝子に特異的な塩基配列を固相化したプレートを用いて、増幅させたサンプルをハイブリダイゼーションさせる（microplate hybridization assay（MHA））ことにより、TCR V 遺伝子を有する T 細胞の生体内における相対頻度（TCR レパトア）を検出する解析系を所有している。これは、抗原特異的な免疫反応によって T 細胞がクローナルに活性化・増殖した場合、正常時と比較することで対応する TCR V 遺伝子の増加が MHA において検出されるものである。したがって無数に存在する T 細胞に対して TCR V 領域におけるスクリーニングが可能となり、特定された TCR V を有する T 細胞の CDR3 のアミノ酸配列解析によってクローンレベルで特定することができる。

TCR レパトア解析法は汎用性が高く、マウスの研究では、松谷らの T 細胞分化に関わる生理学的研究[22]、藤井らの JEV 感染における病態解析[11]、ヒトのサンプルにおける研究では、後藤らの口腔内前癌状態である扁平苔癬に関する研究[23]、堀内らの造血細胞移植に伴う TCR レパトアの変化[24]、松谷らの消化管腫瘍周囲に浸潤する T 細胞の研究[25]、塩原らの潰瘍性大腸炎と細菌性スーパー抗原の関連に関する研究[26]など多岐に渡る。

本研究では、JEV 感染モデルマウスにおいて、予後および重症度と TCR レパトアとの関係性を中心に、免疫学的性状解析、ウイルス特異的 T 細胞の解析を行った。

## 2. 実験方法および材料

### 2. 1. ウイルス

本研究において、JEV は JaOArS982 株 (GenBank accession no.M18370) を使用した。JEV は、乳飲み子マウスに感染させ、脳乳剤より遠心精製し得られたものを Baby Hamster Kidney (BHK) 細胞培養培地より採取した。ウイルスの力価が約  $1.0 \times 10^{10}$  pfu/mL のウイルスを用いた[27]。BHK 細胞は 8% ウシ胎児血清 (FCS) と抗生物質を含むイーグル最小必須場培地 (EMEM; 日水製薬株式会社) で継代されている。ウイルス取扱い、および動物感染実験は文部省における「研究機関などにおける動物実験などの実施に関する基本指針」(文科省学省告示第七十一号) に従って行われた。

### 2. 2. ウイルス接種およびサンプル採取

使用するマウスは過去の報告に基づき、JEV 感染感受性の高い C57/BL6 マウスを用いた[28]。ウイルス接種は 7 週齢のメスの B6 マウスで実施した。JEV 感染群は、2% の FCS を含む EMEM で希釈したウイルス液 ( $1.0 \times 10^4$  pfu, 0.5 mL) を皮下接種した。等量の EMEM を皮下接種した群を非感染群とした。実験 1 として、30 匹のマウスに JEV を皮下接種し、マウスの体重変化と症状の観察を毎日行い、感染後 (days post infection: dpi) 21 日まで計測をした。実験 2 として、30 匹のマウスに JEV を皮下接種し、ウイルス接種日を 0 日として 13 dpi にマウスを吸入麻酔薬 (イソフルラン) の過麻酔により安楽殺した。マウスにおける JEV 感染において、大脳皮質はそのほかの脳組織と比較した際に高いウイルス量が存在することより、主要な標的組織であるという事が報告されている[29]。そのため本研究に

においても、脳内の感染免疫を精査する対象として大脳皮質が選択された。採取した大脳皮質および脾臓はプラーク法を用いたウイルス力価測定用と RNA 抽出用とに分けたのち、直ちに RNAlater® RNA 安定化試薬 (Qiagen) に浸漬した[30]。Total RNA の抽出は、RNeasy Lipid Tissue Mini Kit (Qiagen) を用いてメーカーのプロトコールにしたがって実施した。抽出した total RNA は、バイオアナライザー (Agilent Technologies) において rRNA を指標としたクオリティーチェックを行った。この得られた RNA は qRT-PCR、TCR レパトア解析、および CDR3 シークエンス解析に用いられた。

## 2. 3. 大脳組織におけるウイルス力価の定量

ウイルス感染マウスより採取した新鮮な大脳皮質は、10% ウシ胎児血清を加えた PBS 内でホモジナイズした後に、2% ウシ胎児血清を含む EMEM で希釈した。ウイルス滴定は BHK 細胞を用いたプラーク法を用いて、1g あたりの pfu (pfu/g) を算定した[31]。

## 2. 4. マウスの選択

2. 2.における実験 1 でマウスの体重測定を行った結果、ウイルス接種日の体重と比較して、体重を維持するマウスと、減少していくマウスが認められた。体重の減少が認められたウイルス接種マウスは 21 dpi までに全頭がウイルス感染により死亡した。対照的に、体重を維持したウイルス接種個体の中に死亡した個体は認められなかった。体重推移の観察により、13 dpi においてウイルス接種日と比較して 25%以上体重減少が起こる感染マウスが全頭死亡しているという結果が得られた。この 13 dpi に 25%以上体重が減少する群を死亡群とした。また、体重減少が見られなかった、もしくは 10%未満であった感染マウス内には

死亡した個体は認められなかったため、13 dpi において体重減少が 10%未満の個体群を生存群とした。

## 2. 5. 病理組織学的解析

採取した脳に対して、組織学的および免疫組織化学的解析を実施した。組織は 10% リン酸緩衝ホルマリンで固定された。固定された組織はパラフィン包埋処理後に切片を切り出し、ヘマトキシリンーエオジン染色された。また、免疫組織化学的解析として JEV 抗原の検出は JEV E タンパクに対するウサギポリクローナル抗体を用いた[29]。

## 2. 6. 定量リアルタイム PCR 解析

qRT-PCR を用いて、T 細胞関連表面抗原 (cluster of differentiation ; CD) 抗原、サイトカイン、Th1/Th2 調節上位転写因子、Treg 関連因子、細胞傷害性因子マーカーなどの免疫関連遺伝子における mRNA 発現量を測定した。測定装置は Bio-Rad CFX96 system (Bio-Rad) を用いた。本研究において使用した特異的プライマー (表 1) のうち、glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH)、CD3、CD4、CD8、CD25、CD69、IFN- $\gamma$ 、TNF- $\alpha$ 、IL-4、IL-5、Perforin、Granzyme (Gzm) A、Gzm B、Fas リガンド (Fas L) は過去に報告された配列を用いた[11,32]。Transforming growth factor beta 1 (TGF- $\beta$ 1)、forkhead/winged helix transcription factor 3 (Foxp3)、T-bet、GATA3 特異的プライマーは Takara Bio より購入した。Th1/Th2 調節上位転写因子として、T-bet は IFN- $\gamma$  遺伝子の重要な活性化因子であり[33-35]、GATA3 は IL-5 および IL-13 の転写開始因子として報告されている[36-38]。また、Treg 関連因子として計測された TGF- $\beta$ 1 は免疫抑制効果を持つ主な多機能

サイトカインであることが報告されており[39]、Foxp3 は Treg 特異的分子であり、Treg の分化成熟にも不可欠な分子であることが報告されている[40-43]。組織から抽出した total RNA は、PrimeScript™ RT reagent kit (Takara Bio) を用いて cDNA に合成し、解析サンプルとした。逆転写反応には 50 pmol oligo dT プライマーを用いて 37℃、15 分間反応を行った。合成後、サンプル DNA 2 µL (total RNA 量 50 µg に相当) に 10 mM の forward および reverse プライマーを 0.4 µL、SsoFast™ EvaGreen® Supermix (Bio-Rad) を 10 µL 添加し、distilled water (DW) でメスアップして total 20 µL に調製した。PCR の反応条件は、初期変性反応を 95℃、10 秒、その後のサイクルは 95℃、5 秒および 60℃、30 秒の 2 ステップを 50 サイクル行った。各サンプルのコピー数は、既知濃度のスタンダードサンプルを用いて Ct (threshold cycle) をプロットした検量線から算出し、その値を GAPDH のコピー数で補正した。

JEV の RNA 量は、E 遺伝子特異的プライマー特異的プライマー (5'-ATGACCTCGCTCTCCCCTGG -3', 5'-GACCCAAGAGCAACAACGGA -3') を使用して測定した。各サンプルにおけるコピー数は、*in vitro* にて合成された JEV RNA をスタンダードサンプルとし、これらを用いて Ct をプロットした検量線から算出した。

表 1. qRT-PCR 解析で使したプライマー配列

Targets	Forward primer (5'-3')	Reverse primer (5'-3')
GAPDH	AAATGGTGAAGGTCGGTGTG	TGAAGGGGTCGTTGATGG
CD3	CACTCTGGGCTTGCTGATGG	TCATAGTCTGGGTTGGGAACAGG
CD4	CCCAGGTCTCGCTTCAGTTTG	AGGTAGGTCCCATCACCTCACAG
CD8	GCTGGTAGTCTGCATCCTGCTTC	TTGCTAGCAGGCTATCAGTGTTGTG
CD25	AAGATGAAGTGTGGGAAAACGG	GGGAAGTCTGTGGTGGTTATGG
CD69	AGGATCCATTCAAGTTTCTATCCC	CAACATGGTGGTCAGATGATTCC
IFN- $\gamma$	CGGCACAGTCATTGAAAGCCTA	GTTGCTGATGGCCTGATTGTC
TNF- $\alpha$	AAGCCTGTAGCCCACGTCGTA	GGCACCCTAGTTGGTTGTCTTTG
IL-4	GGGACGCCATGCACGGAGATG	TATGCGAAGCACCTTGGAAGCC
IL-5	TACAGACATGCACCATTGCCAC	ACTTGAGACCCTGATGCAACGA
Foxp3	CTCATGATAGTGCCTGTGTCCTCAA	AGGGCCAGCATAGGTGCAAG
TGF- $\beta$ 1	GTGTGGAGCAACATGTGGAACCTCTA	CGCTGAATCGAAAGCCCTGTA
T-bet	AGGCTGCCTGCAGTGCTTCTA	GGACACTCGTATCAACAGATGCGTA
GATA3	ATGGTACCGGGCACTACCTTTG	TGACAGTTCGCGCAGGATG
Perforin	GCCTGGTACAAAAACCTCCA	AGGGCTGTAAGGACCGAGAT
Granzym A	CCTGAAGGAGGCTGTGAAAG	GAGTGAGCCCCAAGAATGAA
Granzym B	CCATCGTCCCTAGAGCTGAG	TTGTGGAGAGGGCAAACCTTC
FasL	GGGCAGTATTCAATCTTACCAG	GTGCCCATGATAAAGAATAGTAGA

## 2. 7. TCR レパトア解析

AL-PCR 法および MHA 法は、吉田らが確立したマウス TCR レパトア解析法に準拠して行った[44-47]。まず 5 µg の total RNA を Superscript cDNA synthesis kit (Invitrogen) を用いて逆転写反応を行い、引き続き 2 本鎖 DNA に合成した。逆転写反応の際に、*Sph* I 切断部位を有するプライマー (BSL-18E) を用いることにより、DNA サンプルの 3' 末端に *Sph* I 切断部位を付加させた。P10EA/P20EA アダプターをライゲーションさせた後に *Sph* I 消化反応を行うことで、5' 末端にのみアダプターを結合させた DNA サンプルを調製した。これを鋳型として、TCR C 領域に対する特異的プライマー MCA1 または MCB1、およびアダプター部分に相当する P20EA をプライマーとして 1st PCR を行った。引き続き MCA2 または MCB2、および P20EA をプライマーとして 2nd PCR を行い、さらに 5' 末端をビオチン化させたプライマー Bio-MCA3 または Bio-MCB3、および P20EA を用いて 3rd PCR を行い、TCR 遺伝子の特異的に増幅させたビオチン化 DNA サンプルを作製した。PCR 反応はいずれも変性反応 95°C、60 秒、アニーリング反応 55°C、90 秒、伸長反応 72°C、120 秒の条件で 20 サイクル実施した。プライマーの一覧を表 2 にまとめた。また AL-PCR 法の図説を図 1 に示した。



表 2. TCR レパトア解析で使したプライマー配列

Name	Sequence
BSL-18E	5'-AAAGCGGCCGCATGCTTTTTTTTTTTTTTTTTTTVN-3'
P10EA	5'-GGGAATTCGG-3'
P20EA	5'-TAATACGACTCCGAATTCCC-3'
MCA1	5'-TCATGTCCAGCACAGTTTGTG-3'
MCA2	5'-GTTTTTCGGCACATTGATTTG-3'
Bio-MCA3	5'-Bio-AGAGGGTGCTGTCCTGAGAC-3'
MCB1	5'-AGGATTGTGCCAGAAGGTAG-3'
MCB2	5'-TTGTAGGCCTGAGGGTCC-3'
Bio-MCB3	5'-Bio-GAGACCTTGGGTGGAGTCAC-3'

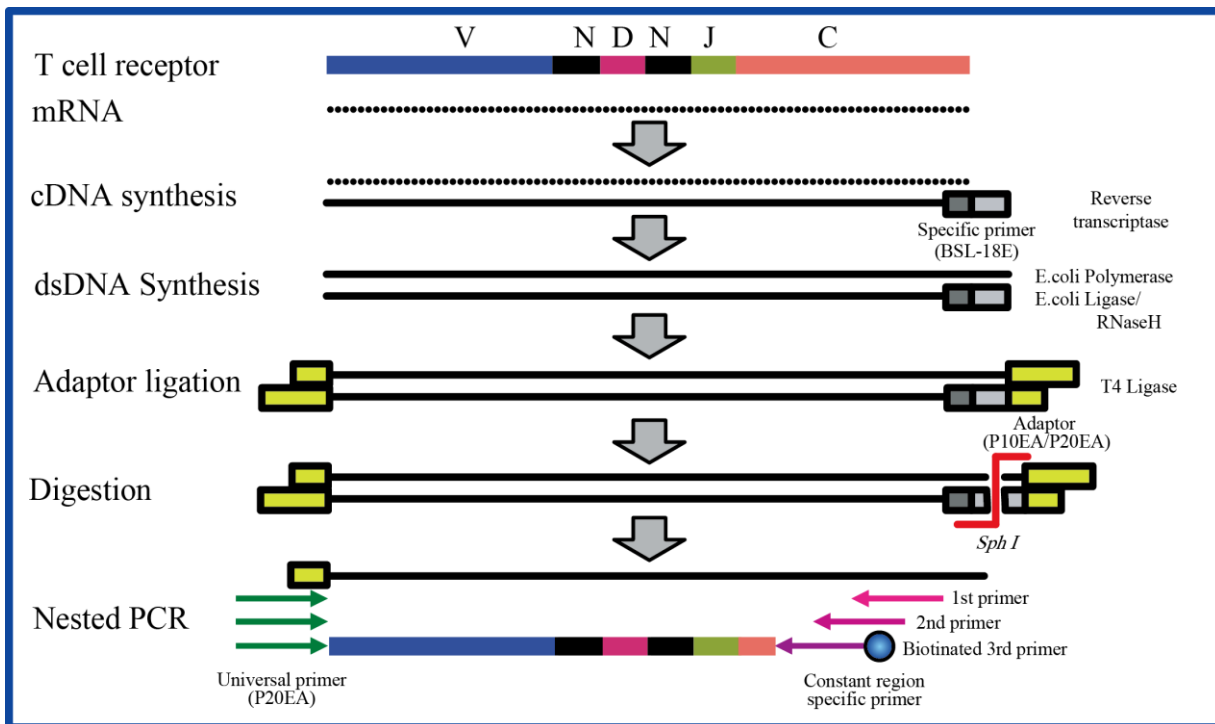


図 1. AL-PCR 法の図説

組織から抽出した total RNA を鋳型として TCR 遺伝子 を特異的に増幅するまでの流れを示す。

TCR AV および TCR BV 各サブファミリーに対する特異的プローブ（表 3）を 96well マイクロプレートに固相化し、使用前に GMCF buffer（0.5 M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1 mM EDTA, 7% SDS, 1% BSA, 7.5% formamide, pH 7.0）で 47℃、30 分間ブレインキュベーションを行った。ピオチン化 DNA サンプルを等量の 0.4N NaOH/10 mM EDTA で変性させた後、GMCF buffer で 100 倍希釈したものをプレートの各 well に 100 μL ずつ添加し、ハイブリダイゼーションのため 47℃、2 時間インキュベーションした。その後 washing buffer（2 × SSC, 0.1% SDS）でプレートを 4 回洗浄し、さらに完全な洗浄のため 37℃、10 分間インキュベーションを行った。再び washing buffer にて 4 回洗浄した後、各 well に TB-TBS（10 mM Tris-HCl, 0.5 M NaCl, 0.5% Tween20, 0.5% blocking reagent; Boehringer, pH 7.4）を添加して室温、30 分間 blocking を行った。次に TB-TBS にて 5000 倍希釈したストレプトアビジン標識アルカリホスファターゼ（R&D Systems）を添加して 37℃、30 分間インキュベーションした。プレートを T-TBS（10 mM Tris-HCl, 0.5 M NaCl, 0.5% Tween20, pH 7.4）で 6 回洗浄した後、100 μL の基質溶液（4 mg/mL *p*-nitrophenylphosphate; Sigma, 10% diethanolamine, pH 9.8）を添加し、発色後に波長 405 nm にて吸光度を測定した。各 TCR V 特異的プローブの TCR C 特異的プローブに対する相対的ハイブリダイゼーション効率（V/C 値）を用いて、測定した吸光度の値を補正した。各サブファミリーの相対頻度は、計算式（相対頻度（%）＝（得られた TCR V 特異的プローブの吸光度／得られた TCR V 特異的プローブの吸光度の合計）× 100）によって計算した。また MHA 法の図説を図 2 に示した。

表 3. TCR レパトア解析で使したプローブ配列

Name	Sequence 5'-3'	Name	Sequence 5'-3'
MVA1-1	AGACTCCCAGCCCAGTGACT	MVB1-1	ACGGTGCCCAGTCGTTTTAT
MVA1-2	ACATCAGAGAGCCGCAACC	MVB2-1	ACACGGGTCACTGATACGGA
MVA1-3	CACATCAAAGAACCACAACCC	MVB3-1	AGTGTCTTCAAACCTCACCTT
MVA2-1	TGCAGTTATGAGGACAGCACTT	MVB4-1	ATGGACAATCAGACTGCCTCA
MVA2-2	CTGCAGTTATGAGAACAGTGCTT	MVB5-1	AGATAAAGGAAACCTGCCCAG
MVA3-1	CTGCAGCTGAGATGCAAGTATT	MVB5-2	GGATTCTACCCAGCAGATTC
MVA3-2	TCCTATGGTGGATCCATTTACC	MVB6-1	GAAGGCTATGATGCGTCTCG
MVA4-1	TCCTGAAAGTCATTACGGCTG	MVB7-1	AAAGGATACAGGGTCTCACGG
MVA4-2	AGAGCCTCAAGGGACAAAGAG	MVB8-1	TGGCTTCCCTTTCTCAGACA
MVA4-3	GGTACCCGACTCTTTTCTGGT	MVB8-2	GGCTACCCCCTCTCAGACAT
MVA4-4	TTTAAAGTCCCAAAGGCCAA	MVB8-3	CCAGAACACGCAAGAAGACT
MVA4-5	ACCCTTTCAGAAGATGACTTCC	MVB9-1	TGAGAAGTTCCAATCCAGTCG
MVA5-1	ACGAAGGACAAGGATTCAGTGT	MVB10-1	TAAACGAAACAGTTCCAAGGC
MVA6-1	GTTCTCTTCAGGGTCCAGA	MVB11-1	ATAGATGATTACAGGGATGCCC
MVA7-1	CCAGACGATTTCGGGAAAGTA	MVB12-1	CGCAGCAAGTCTCTTATGGAA
MVA8-1	ACGCCACTCTCCATAAGAGCA	MVB13-1	GCGACACAGCCACCTATCTC
MVA9-1	AACCTGAAGAAATCCCCAGC	MVB14-1	TTCATCCTAAGCACGGAGAAG
MVA10-1	GCTCTTTGCACATTTCTCTCC	MVB15-1	TTCCCATCAGTCATCCCAAC
MVA11-1	CTGGAGGACTCAGGCACTTACT	MVB16-1	TCACTCTGAAAATCCAACCCA
MVA12-1	CTGTTTATCTCTGCTGACCGG	MVB17-1	GCATCCTGGAAATCCTATCCT
MVA13-1	GACCCAAGGACTCATCGTTTT	MVB18-1	GGACAAGTTTCCAATCAGCCG
MVA14-1	CAGGCAAAGGTCTTGTGTCC	MVB19-1	AAAATGCCCTGCTAAGAAACC
MVA15-1	GTGGACAGAAAACAGAGCCAA	MVB20-1	CAGCCTGGGAATCAGAACG
MVA16-1P	ACGCTCCTAATAGACATTCGCT	MCBS1	TGAGAAATGTGACTCCACCCA
MVA17-1	TTCCATCGGACTCATCATCAC		
MVA18-1	CCCTGCCCAGCTAATCTTAAT		
MVA18-2	GCTCTCTGTCCATCACTGCTG		
MVA19-1	TGGATGGTTTGAAGGACAGTG		
MVA20-1	GGAAGACGGAAGATTCACAGTT		
MCAS1	CATCCAGAACCCAGAACCTGC		

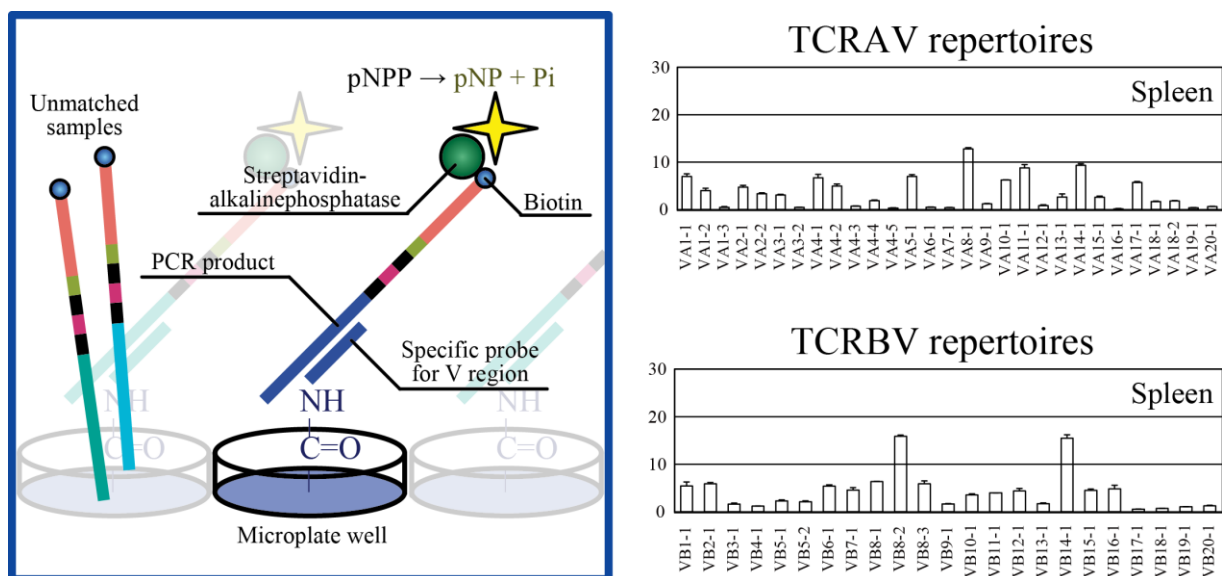


図 2. MHA 法の図説

左側に MHA 模式図、右側に TCR レパトアの結果の例を示す。

## 2. 8. CDR3 アミノ酸配列解析

20 倍希釈した 2nd PCR 産物を鋳型として、各 TCR V に特異的なプライマー（MHA 法に用いたプローブの配列に相当）と TCR C に特異的なプライマー MCA4 または MCB4（MCA3 および MCB3 配列の非ビオチン化プライマー）を用いて上述と同一の条件で 3rd PCR を行った。PCR 産物をアガロースゲルにて電気泳動を行い、目的のバンドを切り出して DNA を精製した。この DNA を pGEM-T Easy Vector（Promega）にライゲーションさせ、DH5α コンピテントセル（TOYOBO）を用いて分子クローニングを行った。無作為に選んだコロニーから精製した各プラスミド DNA クローンについて GenomeLab DTCS Quick Start Kit（Beckman Coulter）を用いてシーケンス PCR を行い、CEQ8000 Genetic Analysis System（Beckman Coulter）にてシーケンス解析した。得られた塩基配列に対して、プラスミド領域のトリミングおよび対象とする TCR V 遺伝子配列を含み、かつ V (D) JC 構造を維持

していることを確認した後、CDR3 領域のアミノ酸配列を決定した。

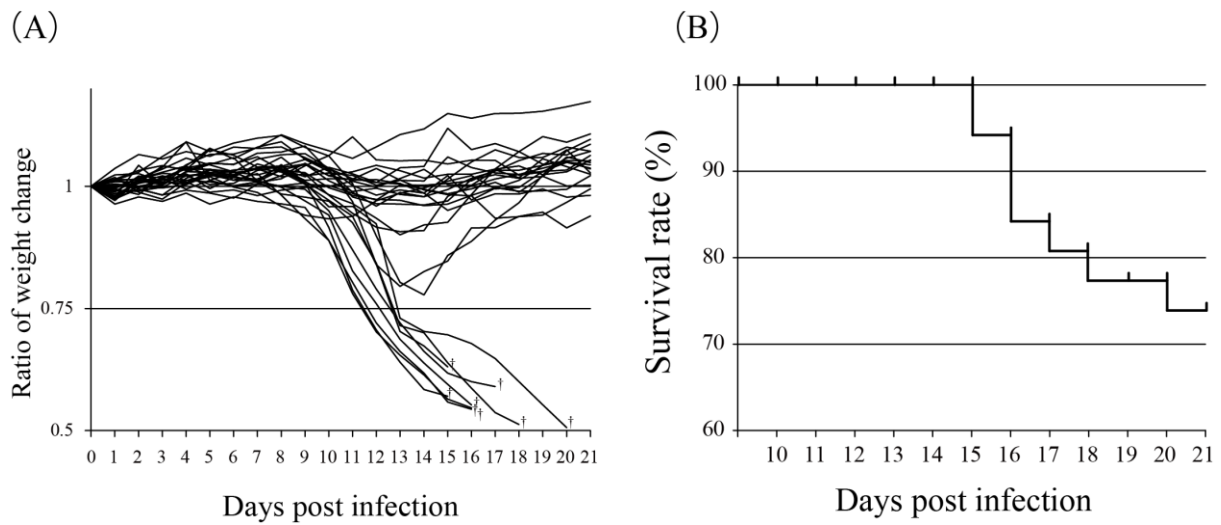
## 2. 9. 統計解析

有意差の評価は、Windows 版 GraphPad PRISM Version 5.0 (GraphPad Software, Inc.) を用いた。qRT-PCR および TCR レパトア解析、J 遺伝子の発現解析の結果に対して分散分析 (ANOVA) 検定を行い、Tukey 検定を post test として行った、統計的に解析し、 $p < 0.05$  を統計的有意とした。生存曲線の有意差検定には Log-rank 試験を行い、 $p$  値を算出した。

### **3. 結果**

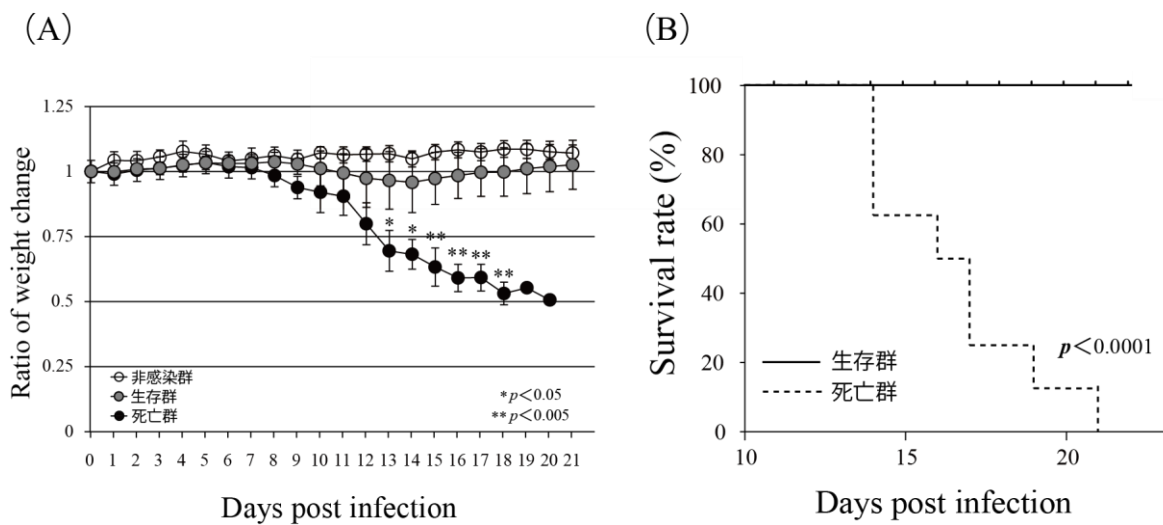
#### **3. 1. 生存群と死亡群の決定**

30 頭のマウスに JEV を皮下接種し、生死と体重の変化をウイルス接種後 21 日 (21 days post-inoculation, dpi) まで観察を行った。8 匹の JEV 感染マウスは 13 dpi までに 25% 以上の体重減少を示し、これらのマウスは 21 dpi までに全頭死亡した (8 / 30) (図 3A, 3B)。また、13 dpi に体重変化がなかったマウス、および体重減少が 10% 未満のマウスの中には死亡する個体はいなかった。この結果は、JEV 感染後の体重変化は予後と関連し、JEV 感染 B6 マウスの予後予測の指標となることを示している。群分け後に群平均体重を基に有意差検定を行ったところ、13 dpi より死亡群は生存群および非感染群と比較して有意に体重減少していた (図 4A)。さらに、群分け後の生存曲線解析では死亡群と生存群では有意に生存曲線が異なることが示された (図 4B)。この結果に基づいて、本実験では JEV 感染マウスを 13 dpi において 25% 以上の体重減少があったマウス群 (死亡群) と、体重減少がなかった、もしくは体重減少が 10% 以下のマウス群 (生存群) の 2 群に群分けを行った (図 4A, 4B)。



**図 3. JEV 感染マウスの体重変化と生存曲線**

(A) JEV 感染マウス (n = 30) の各個体の体重の推移。死亡した時点を (†) で示す。(B) JEV 感染マウス (n = 30) における生存曲線。



**図 4. 生存群と死亡群の体重変化と生存曲線**

(A) JEV 感染マウスを生存群と死亡群に分けた後の群平均の体重推移。死亡群においては 19 dpi 以降 1 個体のみの生存となるため、標準偏差がついていない。(B) 生存群と死亡群に分けたのちの生存曲線。検定は Log-lank 検定で行った。

### 3. 2. 生存群と死亡群における脳内ウイルス量の比較

JEV 感染マウスにおける生存群と死亡群の脳内ウイルス量を検討するため、ウイルス RNA 量およびプラーク法による力価の比較を 13 dpi において評価を行った (図 5)。JEV の RNA 量は感染後 13 dpi で増加していたが、死亡群ではすべての個体の脳内で  $10^6$  コピー以上のウイルス RNA 量を示すのに対し、生存群では検出限界以下のものから死亡群と同程度のウイルス量を示す個体まで、個体によって脳内ウイルス量に大きな差が認められた。プラーク法によるウイルス粒子数の測定においても同様の結果であり、死亡群ではすべての個体が  $10^6$  pfu 以上であるのに対し、生存群では  $10^2 \sim 10^8$  と、個体により大きなばらつきがあることが確認された。本研究では、脳内ウイルス量に依存しない重症化要因を探索することを目的とするため、以降の実験においては生存群の中で JEV ウイルス量が  $10^6$  pfu/g 以上の個体の中から、無作為に 5 個体を選んで生存群として解析を行った。死亡群も同様に無作為に選んだ 5 個体を解析対象とした。この 5 個体をそれぞれ 1 群の死亡群、生存群としたとき、両者には RNA 量においてもプラーク数においても有意差は見られなかった (図 6)。



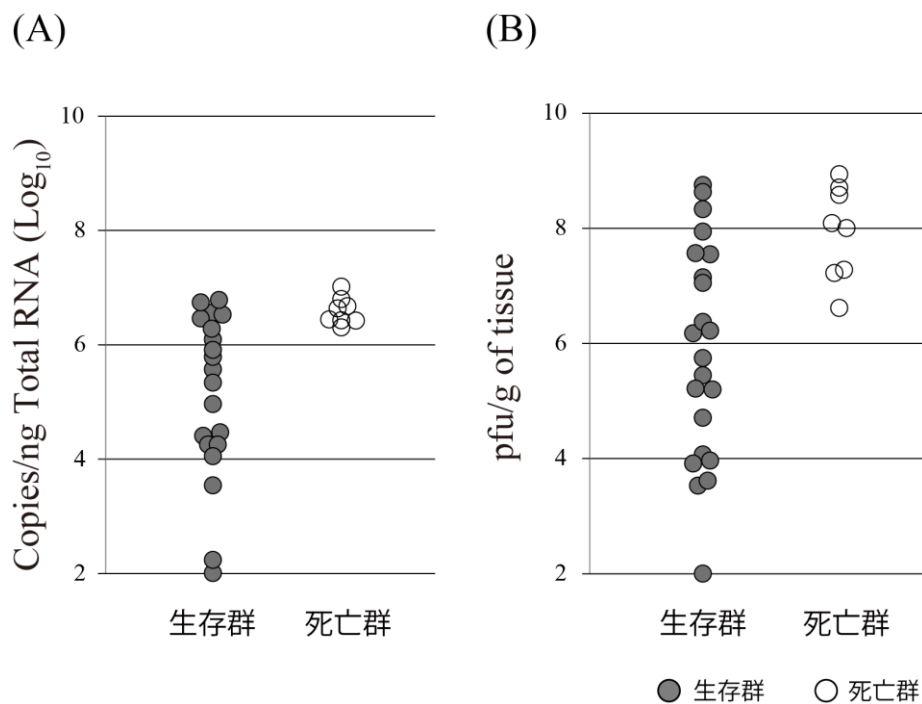


図 5. JEV 感染マウス脳内における JEV RNA 量とプラーク法によるウイルス力価の測定  
 (A) JEV 感染後 13 日後の脳より抽出した Total RNA 1 ng 中の JEV RNA のコピー数と (B) 感染脳組織 1 g 中のプラーク数。丸は各個体の計測値を示す。

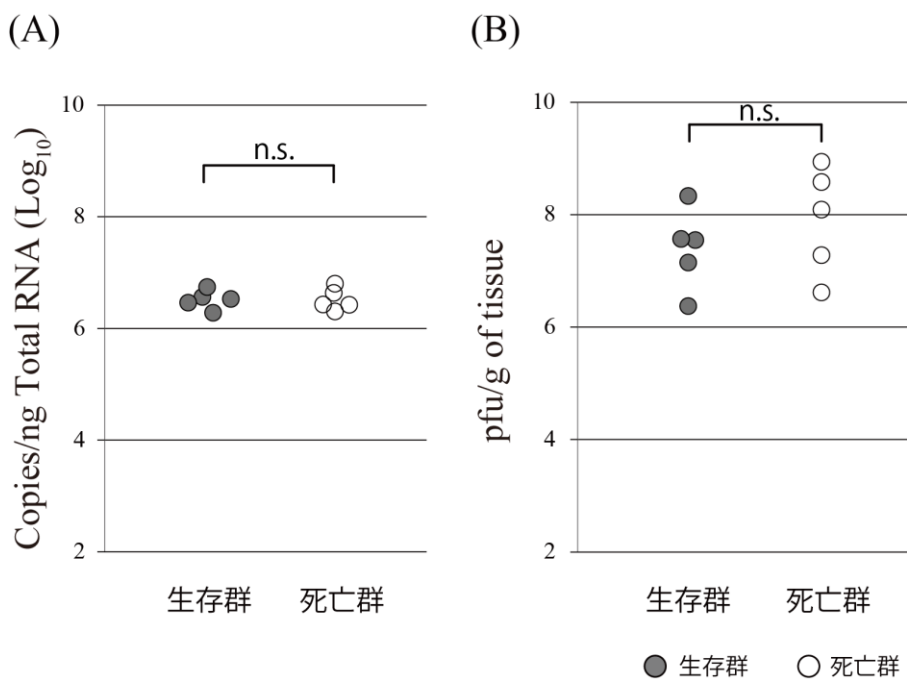
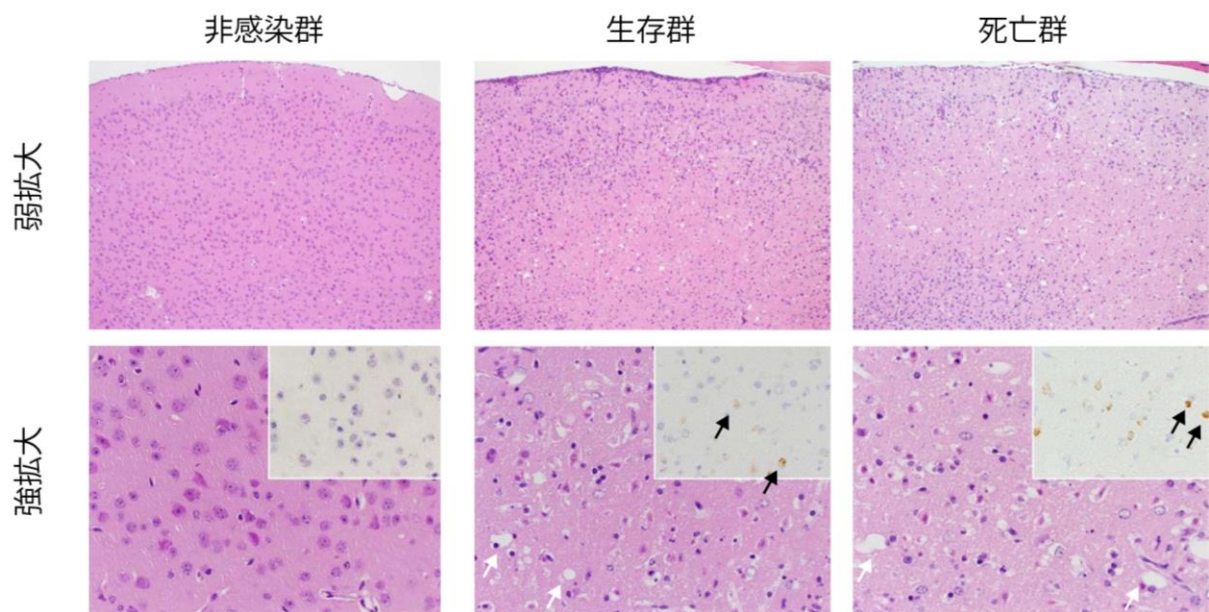


図 6. 生存群と死亡群から選択した個体の脳内 JEV RNA 量とプラーク法によるウイルス力価の測定  
 JEV 感染マウスを生存群と死亡群に群分けしたのちに出した 5 個体の (A) 脳内ウイルス RNA コピー数と (B) 感染脳組織 1 g 中のプラーク数。丸は各個体の計測値を示す。

### 3. 3. JEV 感染マウスの大脳皮質における病理解析

JEV 感染 13 dpi および非感染マウスの大脳皮質に対して、組織学的および免疫組織学的所見を検討した（図 7）。組織病理学的な検査において、JEV 感染群では単核球の炎症性浸潤が認められた。死亡群においては、大脳皮質の広い領域で神経細胞の変性が確認され、神経細胞上で JEV 抗原が確認された。生存群においては死亡群と類似の神経細胞感染を示していたが、大脳皮質における神経細胞の変性は死亡群と比較して少なかった。



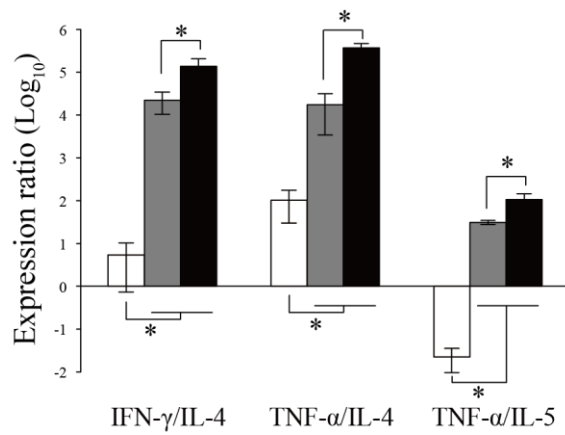
**図 7. JEV 感染マウス的大脑皮質の組織病理学的特徴**

大脑皮質における組織病理像。JEV 抗原は E タンパク特異的抗体を持ちて検出した（黒矢印）。生存群において、神経細胞変性が確認された（白矢印）。いくつかの JEV 抗原陽性細胞が検出された（黒矢印）。死亡群の大脑皮質において神経変性が確認された（白矢印）。ウイルス抗原用背細胞は壊死細胞であった。

### 3. 4. 生存群と死亡群の脳内 Th1、Th2 サイトカインバランスの比較

JEV 感染マウスにおける脳内の免疫性状の評価を行うため、Th1 (IFN- $\gamma$ 、TNF- $\alpha$ ) および Th2 (IL-4、IL-5) 系サイトカインの mRNA 発現レベルを測定し、発現比率 (IFN- $\gamma$  / IL-4、TNF- $\alpha$  / IL-4、TNF- $\alpha$  / IL-5) を 13 dpi で解析した (図 8A)。JEV 感染マウス脳内の IFN- $\gamma$  / IL-4 比率は非感染群と比較して有意に Th1 側に偏ったバランスを示した。また、JEV 感染マウス群の比較では死亡群の脳内 IFN- $\gamma$  / IL-4 バランスは生存群と比較して Th1 側に偏っていた。感染群は TNF- $\alpha$  / IL-4 比率でも非感染群と比較して有意に Th1 側に偏ったバランスを示した。また、JEV 感染マウス群の比較では死亡群の脳内 TNF- $\alpha$  / IL-4 バランスは生存群と比較して有意に Th1 側に偏っていた。さらに、感染群では TNF- $\alpha$  / IL-5 比率でも非感染群と比較して有意に Th1 側に偏ったバランスを示した。JEV 感染マウス内では死亡群の脳内 TNF- $\alpha$  / IL-5 バランスは生存群と比較して有意に Th1 側に偏っていた。Th1 関連サイトカインの産生を亢進させた要因を明らかにするため、2 つのサイトカイン転写制御因子 (T-bet, GATA3) を JEV 感染マウスで測定した (図 8B)。13 dpi で非感染群のマウスと比較して T-bet と GATA3 は JEV 感染マウスで有意に発現量が増加していた。感染マウス群の比較では、死亡群では T-bet の発現量が生存群と比較して有意に増加した。一方、生存群では GATA3 の発現量が死亡群と比較して有意に増加した。

(A)



(B)

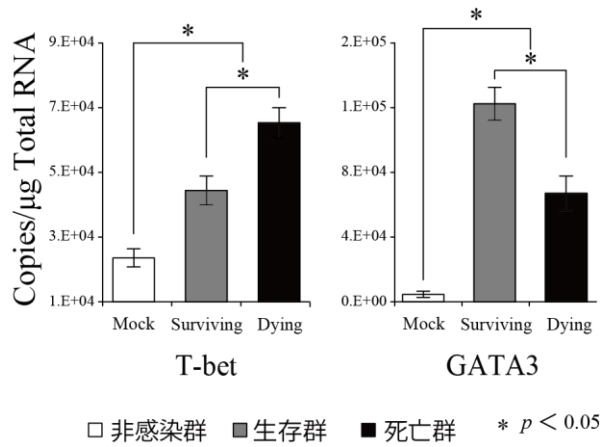
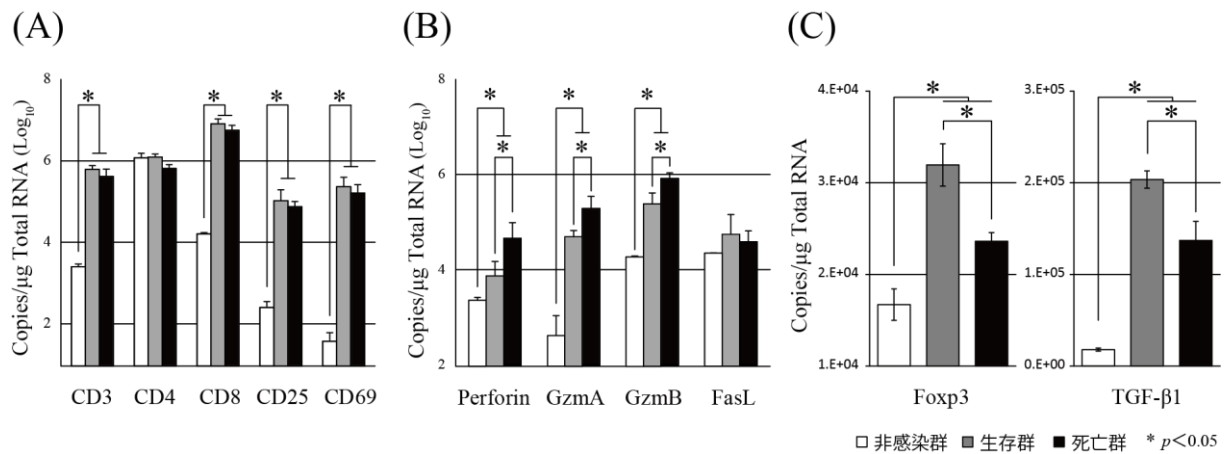


図 8. Th1、Th2 関連遺伝子の発現比率の比較と転写制御因子の qRT-PCR 解析

(A) 13 dpi での JEV 感染マウス脳内の IFN-γ / IL-4、TNF-α / IL-4、TNF-α / IL-5 の発現比率。(B) Th1 および Th2 関連サイトカインの転写制御因子の T-bet と GATA3 の mRNA 発現量。(p < 0.05, ANOVA)

### 3. 5. 脳内浸潤細胞と細胞障害因子マーカーの解析

脳内浸潤細胞の活性化状態を詳細に解析するために、T 細胞抗原標識分子（CD3、CD4、CD8、CD25）、リンパ球活性化標識分子（CD69）（図 9A）、細胞障害因子マーカー（Perforin、Gzm A、Gzm B、Fas L）（図 9B）の発現量を qRT-PCR を用いて解析を行った。JEV 感染群では非感染群と比較して CD3、CD8、CD25、CD69 の発現量が有意に増加していた。しかしながら、死亡群と生存群の間には発現量に有意差は認められなかった。細胞障害因子としての Perforin と Gzm A、Gzm B は生存群と比較して死亡群で有意に発現量が増加していた。次いで、Treg 関連遺伝子（TGF- $\beta$ 1、Foxp3）の発現量を JEV 感染マウスで測定した（図 9C）。TGF- $\beta$ 1 と Foxp3 はともに非感染感染群と比較して JEV 感染群では高い発現量を示した。さらに感染群内では生存群で有意に高い発現量を示した。



**図 9. 脳内浸潤細胞と細胞障害関連遺伝子の qRT-PCR を用いた発現解析**

13 dpi での JEV 感染マウスの脳より抽出した Total RNA 1 μg 中の (A) CD3、CD4、CD8、CD25、CD69、(B) Perforin、Gzm A、Gzm B、(C) Foxp3、TGF-β1 の mRNA 発現量を示す。GAPDH において補正を行った。(p < 0.05, ANOVA)

### 3. 6. 脳内浸潤 T 細胞の TCR レパトア解析

以上の結果により、生存群と死亡群の間で脳内浸潤 CD3+CD8+T 細胞数や活性化因子に差は認められないが、サイトカインの性状や細胞障害因子活性について有意差があることが示された。これらの脳内免疫性状の相違が浸潤 T 細胞の質的な違いによるものかを明らかにするため、脳内浸潤 T 細胞の TCR AV と TCR BV のレパトア解析を行った（図 10）。脾臓におけるレパトア解析においては、TCR AV および TCR BV レパトアいずれにおいても JEV 感染マウスおよび非感染感染マウス間に有意差を認めなかった。一方、JEV 感染マウスの脳において、VA8-1、VA10-1、VB2-1 を発現する T 細胞の相対頻度は、JEV 感染マウスもしくは非感染マウスの脾臓に比べ有意に増加した。一方、これらの TCR を発現する T 細胞の相対頻度は生存群と死亡群間の脳において差が認められなかった。非感染群のマウス脳内では TCR AV、TCR BV とともにリンパ球数が低く、レパトア解析における検出限界以下であった（data not shown）。



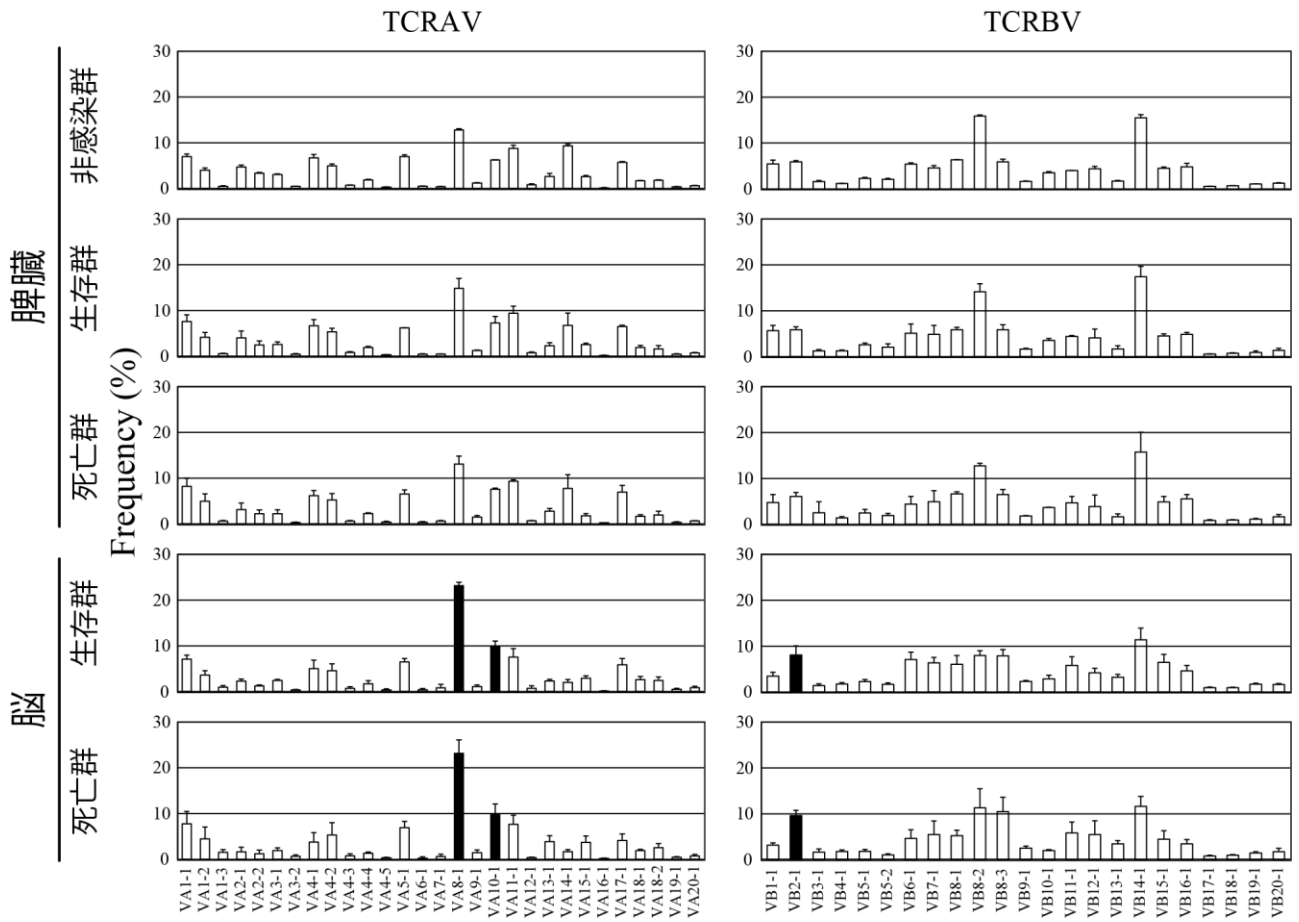


図 10. JEV 感染マウスにおける脾臓と脳の TCR レパトア解析

マウスに JEV もしくは EMEM を接種し、13 dpi に採取した脳および脾臓の TCR AV および TCR BV のレパトアを示した。棒グラフは 5 個体の平均値、エラーバーは SD を示す。各ファミリーにおいて、非感染群の脾臓と比較して発現量が高く、有意差が認められたものを黒棒にした ( $p < 0.05$ )。

### 3. 7. 生存群と死亡群の脳内浸潤 T 細胞における CDR3 アミノ酸配列解析

PCR により増幅され、ランダムに選択された cDNA クローンを用いて VA8-1、VA10-1、VB2-1 の CDR3 アミノ酸配列を解析した。JEV 感染マウスの脳から得られた浸潤 T 細胞の CDR3 アミノ酸配列は cDNA クローン頻度とともに、個体ごとに示した (図 11 - 13)。非感染群の脾臓において 30 以上の cDNA クローンの解析を行ったが、同一配列のクローンは存在しなかった (data not shown)。

VA8-1 の解析において、死亡群のマウスから 4 種の同一のクローン型 (CAL-R-SSNTNKVVF (5 頭/5 頭中)、CAL-RM-SNYNVLYF (3 頭/5 頭中)、CAL-RR-SNYNVLYF (3 頭/5 頭中)、CALS-G-SNYNVLYF (2 頭/5 頭中)) が得られた (図 11)。死亡群の脳内から検出されたアミノ酸配列の中で、2 つのクローン型 (CAL-R-SSNTNKVVF、CAL-RR-SNYNVLYF) は生存群の脳内からもアミノ酸配列として検出されたが、各々のアミノ酸配列は生存群の 1 個体ずつに確認されたのみであった。

VA10-1 の解析においては生存群内で複数の個体に共通する 4 種のクローン型 (CA-P-DSNYQLIW (4 頭/5 頭中)、CA-F-SGGSNAKLTF (3 頭/5 頭中)、CA-PM-SNYNVLYF (2 頭/5 頭中)、CA-I-DSNYQLIW (2 頭/5 頭中)) が確認された (図 12)。一方で、死亡群内においても複数の個体に共通する 6 種のクローン型 (CAL-G-GSALGRLHF (4 頭/5 頭中)、CAL-GY-YNQGKLIF (3 頭/5 頭中)、CAL-ID-SNYNVLYF (2 頭/5 頭中)、CAL-GG-NYAQGLTF (2 頭/5 頭中)、CAL-RG-ATGGNNKLTF (2 頭/5 頭中)、CA-R-NYNVLYF (2 頭/5 頭中)) が確認された。1 クローンのみ生存群と死亡群の各 1 個体に共通するクローンが確認され

た (CAL-RGSALGRLH) が生存群と死亡群でそれぞれ共通するクローンは完全に異なった。

VB2-1 の解析では生存群内で複数の個体間に共通する 2 種のクローン型 (CSA-ETLYF (4 頭/5 頭中)、CSA-DWG-SYEQYF (2 頭/5 頭中)) が検出されたが、そのクローンは死亡群の 1 個体にもそれぞれ確認された (図 13)。また、死亡群内の複数の個体間に共通する 2 種のクローン型 (CSA-RLG-SYEQYF (4 頭/5 頭中)、CS-PYN-SGNTLYF (2 頭/5 頭中)) が確認され、生存群の 1 個体にもそれぞれ同一クローンが確認された。また、生存群と死亡群にそれぞれ 4 頭ずつの個体に共通して確認されたクローン型 (CSA-GLGG-EQYF) も存在していた。

次いで VA8-1 と VA10-1 について J 遺伝子の使用頻度を解析したところ (図 14)、各々の  $\alpha$  鎖内での使用頻度として、VA8-1/AJ23、VA8-1/AJ31、VA10-1/AJ33、VA10-1/AJ42 の組み合わせの存在頻度が死亡群と比較して生存群で有意に増加していた。一方で、VA8-1/AJ21 は生存群と比較して死亡群で存在頻度が有意に増加していた。

# VA8-1 生存群 脳内

	Clonal frequency	CDR3			J gene
		V	N	J	
#1	2/15	CALS	E	SNMGYKLTF	AJ09
	2/15	CAL	KA	GNTGKLIF	AJ37
	1/15	CALS	D	SGTYQRFGT	AJ13
	1/15	CAL	RR	SNYNVLYF	AJ21
	1/15	CALS	EG	NQGKLIF	AJ23
	1/15	CALS	AAV	NYNQGKLIF	AJ23
	1/15	CAL	RG	TNTGKLTF	AJ27
	1/15	CALS	AP	NTNTGKLTF	AJ27
	1/15	CALS	DG	NSNNRIFF	AJ31
	1/15	CALS	KG	NSNNRIFF	AJ31
	1/15	CALS	Y	NNAGAKLTF	AJ39
	1/15	CALS	EN	YANKMIF	AJ47
	1/15	CALS	H	TGYQNFYF	AJ49
#2	1/13	CAL	R	TGGYKVVF	AJ12
	1/13	CAL	RA	NSGTYQRF	AJ13
	1/13	CAL	RD	QGGRALIF	AJ15
	1/13	CALS	DRVY	QGKLIF	AJ23
	1/13	CALS	DH	TNAYKVIF	AJ30
	1/13	CAL	RV	TNAYKVIF	AJ30
	1/13	CAL	MGR	NSNNRIFF	AJ31
	1/13	CALS	G	GSSGNKPIF	AJ32
	1/13	CALS	ET	NTNKVVF	AJ34
	1/13	CAL	R	SSNTNKVVF	AJ34
	1/13	CALS	DP	GFASALTF	AJ35
	1/13	CALS	DR	GSNAKLTF	AJ42
	1/13	CALS	P	SSSFSKLVF	AJ50
#3	3/14	CALS	G	SSNTNKVVF	AJ23
	3/14	CALS	GLPY	TNKVVF	AJ34
	1/14	CALS	GG	NMGYKLTF	AJ09
	1/14	CALS	H	NSAGNKLTF	AJ17
	1/14	CALS	VS	NYNQGKLIF	AJ23
	1/14	CAL	V	NNYAQGLTF	AJ26
	1/14	CALS	EG	NSNNRIFF	AJ31
	1/14	CAL	RPW	NSNNRIFF	AJ31
	1/14	CALS		NTGYQNFYF	AJ49
	1/14	CA	RP	ASSFSLVF	AJ50
#4	3/13	CAL	RP	SNSNNRIFF	AJ31
	2/13	CALS	GS	NSAGNKLTF	AJ17
	2/13	CALS	GG	QLIF	AJ22
	1/13	CALS	V	RGSALGRLHF	AJ18
	1/13	CAL	RY	TNAYKVIF	AJ30
	1/13	CALS		SNNRIFF	AJ31
	1/13	CALS	H	SNNRIFF	AJ31
	1/13	CALS	Y	NNAGAKLTF	AJ39
	1/13	CALS		NYKYVF	AJ40
1/13	CALS	R	KYVF	AJ40	
#5	1/12	CALS	H	YSNNRLTL	AJ07
	1/12	CALS	GH	SGTYQRF	AJ13
	1/12	CALS	EG	GGRALIF	AJ15
	1/12	CALS	DRGSALGRLHF		AJ18
	1/12	CAL	RV	SNYNVLYF	AJ21
	1/12	CALS		YNQGKLIF	AJ23
	1/12	CALS	D	NNRIFF	AJ31
	1/12	CALS	KVAY	NRIFF	AJ31
	1/12	CALS	HAT	KVVF	AJ34
	1/12	CAL	RT	SNTNKVVF	AJ34
	1/12	CAL	RA	SNTNKVVF	AJ34
	1/12	CAL		TGYQNFYF	AJ49

# VA8-1 死亡群 脳内

	Clonal frequency	CDR3			J gene
		V	N	J	
#1	3/15	CAL	R	SSNTNKVVVF	AJ34
	2/15	CAL	NCG	NMGYKLTF	AJ09
	1/15	CAL		TQVVGQLTF	AJ05
	1/15	CAL	RR	SNYNVLYF	AJ21
	1/15	CAL	KE	SNYNVLYF	AJ21
	1/15	CAL	T	NYNVLYF	AJ21
	1/15	CAL	RG	SNYNVLYF	AJ21
	1/15	CAL		NNYAQGLTF	AJ26
	1/15	CAL	MG	TNAYKVIF	AJ30
	1/15	CALS	ES	YQNFYF	AJ49
	1/15	CALS	GPNTGANTGKLT	F	AJ52
	1/15	CAL	RK	GGSAKLIF	AJ57
#2	5/16	CAL	R	SSNTNKVVVF	AJ34
	1/16	CALS	GG	MGYKLTF	AJ09
	1/16	CALS	P	RGSALGRLHF	AJ18
	1/16	CALS	V	SNYNVLYF	AJ21
	1/16	CALS	G	SNYNVLYF	AJ21
	1/16	CA	FPM	SNYNVLYF	AJ21
	1/16	CALS		NNYAQGLTF	AJ26
	1/16	CAL	T	NTNKVVVF	AJ34
	1/16	CAL	RY	NNAGAKLTF	AJ39
	1/16	CALS	ETY	GGSNAKLTF	AJ42
	1/16	CALS		NTGYQNFYF	AJ49
	1/16	CALS	G	TGYQNFYF	AJ49
#3	6/15	CAL	RM	SNYNVLYF	AJ21
	4/15	CAL	R	SSNTNKVVVF	AJ34
	1/15	CAL	RMSS	YNVLYF	AJ21
	1/15	CALS	GTT	ASLGKLQF	AJ24
	1/15	CAL	RGA	NSNNRIFF	AJ31
	1/15	CAL	R	VTGSGGKLT	AJ44
	1/15	CAL	R	ASSFSLVLF	AJ50
#4	4/16	CALS	G	YNVLYF	AJ21
	2/16	CAL	RM	SNYNVLYF	AJ21
	2/16	CAL	R	SSNTNKVVVF	AJ34
	1/16	CALS	EGP	SSGQKLVF	AJ16
	1/16	CAL	RR	SNYNVLYF	AJ21
	1/16	CALS	D	LPGTGSNRLTF	AJ28
	1/16	CALS	ET	NNRIFF	AJ31
	1/16	CALS	D	NNAGAKLTF	AJ39
	1/16	CALS	AM	NNNAGAKLTF	AJ39
	1/16	CALS	F	GSGGKLT	AJ44
1/16	CALS		NTGYQNFYF	AJ49	
#5	6/15	CAL	R	SSNTNKVVVF	AJ34
	2/15	CAL	RM	SNYNVLYF	AJ21
	1/15	CAL	TH	YSNNRLTF	AJ07
	1/15	CAL		NSAGNKLTF	AJ17
	1/15	CAL	RR	SNYNVLYF	AJ21
	1/15	CAL	R	NNYAQGLTF	AJ26
	1/15	CALS	GD	NTNTGKLT	AJ27
	1/15	CAL		SNTNKVVVF	AJ34
1/15	CAL	K	SSNTNKVVVF	AJ34	

図 11. JEV 感染マウスの脳内浸潤 T 細胞における VA8-1 クローン CDR3 領域アミノ酸配列個体間において認められた同一配列を同色で示した。

# VA10-1 生存群 脳内

	Clonal frequency	CDR3			J gene
		V	N	J	
#1	3/15	CA	IRR	DSNNRIFF	AJ31
	2/15	CAL	P	GTQVVGQLTF	AJ05
	2/15	CA	F	SGGSNAKLTF	AJ42
	2/15	CA	RG	ASSSFSKLVF	AJ50
	1/15	CAL	S	QVVGQLTF	AJ05
	1/15	CA	IDE	SGSWQLIF	AJ22
	1/15	CALS	D	SGSWQLIF	AJ22
	1/15	CA	LGP	NTSKVVF	AJ34
	1/15	CA	FL	SGGSNAKLTF	AJ42
1/15	CAL	VI	SSSFSKLVF	AJ50	
#2	3/16	CA	F	SGGSNAKLTF	AJ42
	2/16	CA	P	DSNYQLIW	AJ33
	1/16	CAL		DRGSALGRLHF	AJ18
	1/16	CA	L	DRGSALGRLHF	AJ18
	1/16	CA	PM	SNYNVLYF	AJ21
	1/16	CA		PGTGSNRLTF	AJ28
	1/16	CAL	AL	SNNRIFF	AJ31
	1/16	CAL	D	YGSSGNKLIF	AJ32
	1/16	CA	Y	VTGSGGKLT	AJ44
	1/16	CAL		ASSSFSKLVF	AJ50
	1/16	CA	SP	SSSFSKLVF	AJ50
	1/16	CA		NQGGSAKLIF	AJ57
1/16	CA	IER	GTGSKLSE	AJ58	
#3	7/15	CA	P	DSNYQLIW	AJ33
	2/15	CA	IDR	SGSWQLIF	AJ22
	1/15	CAL	PRG	SNMGYKLT	AJ09
	1/15	CA	MAW	NSNNRIFF	AJ31
	1/15	CA	I	DSNYQLIW	AJ33
	1/15	CALS	G	SNTNKVVF	AJ34
	1/15	CA	SS	NNAGAKLT	AJ39
	1/15	CA	W	ASSSFSKLVF	AJ50
#4	3/15	CAL		RGSALGRLHF	AJ18
	3/15	CA	P	DSNYQLIW	AJ33
	2/15	CA	F	SGGSNAKLTF	AJ42
	1/15	CA	R	GTGGYKVV	AJ12
	1/15	CA	ST	GTGGYKVV	AJ12
	1/15	CA	SHL	GGRALIF	AJ15
	1/15	CAL		YQGGRALIF	AJ15
	1/15	CA	I	GSALGRLHF	AJ18
	1/15	CAL		RGSALGRLHF	AJ18
1/15	CA	G	DNSKLIW	AJ38	
#5	5/16	CAL	VS	NSAGNKLT	AJ17
	2/16	CA	PM	SNYNVLYF	AJ21
	2/16	CA	P	DSNYQLIW	AJ33
	1/16	CAL	GGR	GSFNKLT	AJ04
	1/16	CA	MVK	GGRALIF	AJ15
	1/16	CA	MVP	GSWQLIF	AJ22
	1/16	CA	MER	YAQGLTF	AJ26
	1/16	CA	MAF	TNAYKVIF	AJ30
	1/16	CA	I	DSNYQLIW	AJ33
1/16	CA	I	TGNYKYVF	AJ40	

# VA10-1 死亡群 脳内

	Clonal frequency	CDR3			J gene
		V	N	J	
#1	4/15	CA	S	SNMGYKLT	AJ09
	2/15	CA	G	YGSSGNKLIF	AJ32
	3/15	CAL	G	GSALGRLHF	AJ18
	1/15	CAL	GY	YNQGKLIF	AJ23
	1/15	CA	P	YGSSGNKLIF	AJ32
	1/15	CA	T	DSNYQLIW	AJ33
	1/15	CA	H	NNAGAKLT	AJ39
	1/15	CA	MEAI	ASSSFSKLVF	AJ50
1/15	CA	I	ASSSFSKLVF	AJ50	
#2	4/16	CALS		GSALGRLHF	AJ18
	4/16	CAL	G	GSALGRLHF	AJ18
	2/16	CAL	A	NQGGSAKLIF	AJ57
	1/16	CA	MV	SNMGYKLT	AJ09
	1/16	CA	IS	SNMGYKLT	AJ09
	1/16	CA	MERG	SGTYQRF	AJ13
	1/16	CAL	R	SNYNVLYF	AJ21
	1/16	CA	ID	SNYNVLYF	AJ21
1/16	CAL	G	GNYGNEKITF	AJ48	
#3	4/14	CA	MDF	NNAGAKLT	AJ39
	4/14	CAL	G	GSALGRLHF	AJ18
	1/14	CAL	GG	NYAQLTF	AJ26
	1/14	CA	D	TNTGKLT	AJ27
	1/14	CA	MAW	NSNNRIFF	AJ31
	1/14	CAL	P	SSSFSKLVF	AJ50
	1/14	CA	IDRNTGANTGKLT	AJ52	
1/14	CAL	RG	ATGGNNKLT	AJ56	
#4	2/15	CAL	G	GSALGRLHF	AJ18
	2/15	CAL	GY	YNQGKLIF	AJ23
	2/15	CAL	G	NYAQLTF	AJ26
	2/15	CAL	DLW	NSNNRIFF	AJ31
	1/15	CA		TGGYKVV	AJ12
	1/15	CAL		TNSAGNKLT	AJ17
	1/15	CAL	M	NYNQGKLIF	AJ23
	1/15	CA	IAP	NTNTGKLT	AJ27
	1/15	CAL	V	SSNTNKVV	AJ34
	1/15	CA	P	GNTGKLIF	AJ37
1/15	CAL	RG	ATGGNNKLT	AJ56	
#5	3/15	CA	ID	SNYNVLYF	AJ21
	2/15	CA		TSGGNYKPT	AJ06
	2/15	CAL	GY	YNQGKLIF	AJ23
	1/15	CAL	G	NMGYKLT	AJ09
	1/15	CA	IS	SNMGYKLT	AJ09
	1/15	CAL		RGSALGRLHF	AJ18
	1/15	CA	R	SNYNVLYF	AJ21
	1/15	CAL	GG	NYAQLTF	AJ26
	1/15	CA	M	NYAQLTF	AJ26
	1/15	CA	M	DSNYQLIW	AJ33
	1/15	CA	V	DSNYQLIW	AJ33

図 12. JEV 感染マウスの脳内浸潤 T 細胞における VA10-1 クローン CDR3 領域アミノ酸配列個体間において認められた同一配列を同色で示した。主に生存群で共通した配列を寒色系、死亡群で共通して見られた配列を暖色系で示した。両群に同程度共通したクローンは灰色で示した。

# VB2-1 生存群 脳内

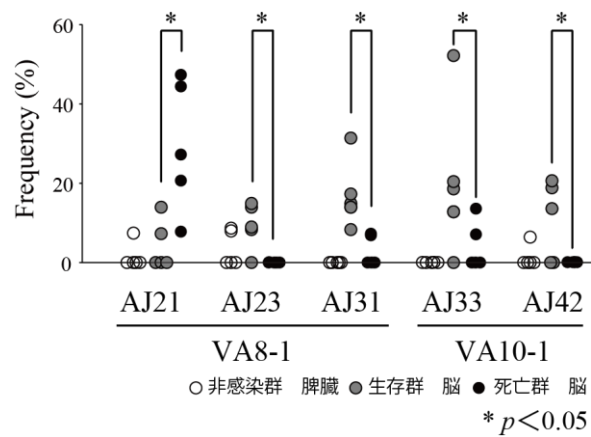
	Clonal frequency	CDR3			J gene
		V	N-D-N	J	
#1	3/14	CS	PYN	SGNTLYF	BJ1.3
	2/14	CSA		ETLYF	BJ2.3
	1/14	CSA	GP	NSDYTF	BJ1.2
	1/14	C		NNQAPLF	BJ1.5
	1/14	CS	GGGNQ	APLF	BJ1.5
	1/14	CSA	GLGG	EQYF	BJ2.7
	1/14	CSA	RLG	YEQYF	BJ2.7
	1/14	CS	DWR	EQYF	BJ2.7
	1/14	CSA	VARS	SYEQYF	BJ2.7
	1/14	CSA	DQGV	SYEQYF	BJ2.7
	1/14	CSA	GGF	EQYF	BJ2.7
	2/14	CSA	WGG	NYAEQFF	BJ2.1
	2/14	CSA	GLGG	EQFF	BJ2.1
	2/14	CSA	DHRG	EQYF	BJ2.7
#2	2/14	CSA	DWG	SYEQYF	BJ2.7
	1/14	CSA	DRGR	TEVFF	BJ1.1
	1/14	CS	PGLG	YAEQFF	BJ2.1
	1/14	CAS	GGW	NYAEQFF	BJ2.1
	1/14	CSA	RQK	DTQYF	BJ2.5
	1/14	CSA	GH	EQYF	BJ2.7
	1/14	CSA	GLGG	EQYF	BJ2.7
	7/15	CSA		ETLYF	BJ2.3
	2/15	CSA	VARS	SAETLYF	BJ2.3
	2/15	CSA	V	SAETLYF	BJ2.3
#3	2/15	CS	LEAV	SAETLYF	BJ2.3
	1/15	CSA	GGR	EQYF	BJ2.7
	1/15	CSA		SYEQYF	BJ2.7
	3/14	CSA		ETLYF	BJ2.3
	2/14	CS	GRQGR	EQYF	BJ2.7
#4	1/14	CSA	DHR	NSDYTF	BJ1.2
	1/14	CSA	SA	NTGQLYF	BJ2.2
	1/14	CSA	ED	TGQLYF	BJ2.2
	1/14	CS	PDWGG	NTLYF	BJ2.4
	1/14	CSA	GLGG	EQYF	BJ2.7
	1/14	CSA		SYEQYF	BJ2.7
	1/14	CSA	RAY	SYEQYF	BJ2.7
	1/14	CSA	DTTS	SYEQYF	BJ2.7
	1/14	CSA		SYEQYF	BJ2.7
	2/15	CSA	V	GNTLYF	BJ1.3
	2/15	CSA		ETLYF	BJ2.3
#5	1/15	CSA	GHLN	SGNTLYF	BJ1.3
	1/15	CSA	QGAH	AEQFF	BJ2.1
	1/15	CSA	GQGA	YAEQFF	BJ2.1
	1/15	CSA	DWGS	SAETLYF	BJ2.3
	1/15	CSA	A	SQNTLYF	BJ2.4
	1/15	CSA	DWGI	SQNTLYF	BJ2.4
	1/15	CS	GQGAR	DTQYF	BJ2.5
	1/15	CSA	DWG	SYEQYF	BJ2.7
	1/15	CS	DWGGF	EQYF	BJ2.7
	1/15	CSA	GLGG	EQYF	BJ2.7
	1/15	CSA	ELGS	EQYF	BJ2.7

# VB2-1 死亡群 脳内

	Clonal frequency	CDR3			J gene
		V	N-D-N	J	
#1	3/15	CSA	ALG	AEQFF	BJ2.1
	3/15	CSA	EPGK	NTGQLYF	BJ2.2
	2/15	CSA	RLG	SYEQYF	BJ2.7
	1/15	CSA	NNQ	QPAPLF	BJ1.5
	1/15	CSA	DD	DDNSPLYF	BJ1.6
	1/15	CSA	WGG	DTQYF	BJ2.5
	1/15	C	GVGLGD	EQYF	BJ2.7
	1/15	CSA	NSG	SYEQYF	BJ2.7
	1/15	CSA	TGGS	SYEQYF	BJ2.7
	1/15	CSA	TGGD	SYEQYF	BJ2.7
	4/14	CSA	RLG	SYEQYF	BJ2.7
	2/14	CSA	DWGA	SQNTLYF	BJ1.3
	2/14	CSA	GLGG	EQYF	BJ2.7
	1/14	CSA	DLG	AEQFF	BJ2.1
#2	1/14	CS	GTT	NTGQLYF	BJ2.2
	1/14	CSA	DIDR	DTQYF	BJ2.5
	1/14	CSA	EGQ	NQDTQYF	BJ2.5
	1/14	CSA	GHM	SYEQYF	BJ2.7
	1/14	CSA	DWG	SYEQYF	BJ2.7
	3/14	CSA	GLGD	EQYF	BJ2.7
	3/14	CSA	GLGG	EQYF	BJ2.7
	2/14	CSA	RLG	SYEQYF	BJ2.7
	1/14	CSA	AGGT	SGNTLYF	BJ1.3
	1/14	CSA	EQV	SGNTLYF	BJ1.3
#3	1/14	CSA	DLF	SNERLFF	BJ1.4
	1/14	CSA	GTGV	AEQFF	BJ2.1
	1/14	CSA	GSGGA	AEQFF	BJ2.1
	1/14	CSA	LGGAG	AETLYF	BJ2.3
	3/14	CSA	RLG	SYEQYF	BJ2.7
	2/14	CSA	DFG	NTEVFF	BJ1.1
	1/14	CS	PYN	SGNTLYF	BJ1.3
	1/14	CSA	AGF	SNERLFF	BJ1.4
	1/14	CSA	QTRGG	YAEQFF	BJ2.1
	1/14	CS	GTD	SAETLYF	BJ2.3
#4	1/14	CSA	GGD	NTLYF	BJ2.4
	1/14	C	KLGP	QDTQYF	BJ2.5
	1/14	CSA	GLGG	EQYF	BJ2.7
	1/14	CSA	DRLGGL	EQYF	BJ2.7
	1/14	CSA	DLGD	EQYF	BJ2.7
	2/14	CS	PYN	SGNTLYF	BJ1.3
	2/14	CSA	RGQA	GQLYF	BJ2.2
	1/14	CSA	EGGRE	EVFF	BJ1.1
	1/14	CSA	DLAN	SGNTLYF	BJ1.3
	1/14	CR	GQ	SNERLFF	BJ1.4
	1/14	C	RGQ	SNERLFF	BJ1.4
#5	1/14	CS		NYAEQFF	BJ2.1
	1/14	CSA	QG	NTGQLYF	BJ2.2
	1/14	CSA	RA	NTGQLYF	BJ2.2
	1/14	CSA		ETLYF	BJ2.3
	1/14	CS	GGLG	ETLYF	BJ2.3
	1/14	CSA	GLGG	EQYF	BJ2.7

図 13. JEV 感染マウスの脳内浸潤 T 細胞における VB2-1 クローン CDR3 領域アミノ酸配列  
 個体間において認められた同一配列を同色で示した。主に生存群で共通した配列を寒色系、死亡  
 群で共通して見られた配列を暖色系で示した。両群に同程度共通したクローンは灰色で示した。





**図 14. JEV 感染マウスの脳内 TCR クローンにおける J 遺伝子の使用頻度の解析**  
 $\alpha$  鎖における J 遺伝子の使用頻度を算出し、有意差検定を行った。白丸で非感染群の脾臓、灰色丸で生存群の脳、黒丸で死亡群の脳における各個体の J 遺伝子の使用頻度を示した。(  $p < 0.05$ , ANOVA )

#### **4. 考察**

本実験における JEV 感染マウスの致死率はすでに報告されている 20 – 30% の範囲内であった。また、JEV 感染マウス脳内よりウイルスが検出されるとともに mRNA レベルにおいても CD3 および CD8 の発現量が増加しており、非感染マウスにおいてはほとんど存在しない T 細胞が JEV 感染によって血液脳関門を越えてマウスの脳内に浸潤したことを示しており、本実験系の感染モデルマウスは JEV 感染モデルとして適切であったと考えられる。

JEV と同様にフラビウイルス科フラビウイルス属に属するダニ媒介性脳炎ウイルス (TBEV) において、感染予後を体重を指標として予測することができるという報告がなされている[31]。本実験で使用した JEV S982 感染マウスについても感染予後は体重変化とよく相関しており、JEV 感染マウスの予後を評価するにあたって体重変化は単純かつ有用な指標であることが確認された。TBEV 感染マウスにおける重症度と脳内ウイルス量および免疫環境の比較についての報告では生存群と死亡群では脳内ウイルス量での差は認められていない[31,48]。JEV を用いた本実験において、生存群では個体により脳内ウイルス量に大きなばらつきが認められたが、本実験においては死亡群と同レベルの脳内ウイルス量を呈した個体を無作為に選択し、解析対象とした。この脳内ウイルス量の高い生存群の存在より、JEV 感染症の予後が脳内ウイルス価のみにより決定されていることではないことを示している。

JEV 感染後の宿主免疫応答の重症度への関与を調べるため、脳内の局所免疫の評価を qRT-PCR を用いて行った結果、Th1 系サイトカインと Th2 系サイトカインの発現比率が死



亡群では生存群と比較して有意に Th1 側に偏っていることが明らかとなった。そのサイトカインバランスを形成している上位転写制御因子レベルにおいても死亡群では T-bet の発現量が生存群と比較して有意に高発現しており、また GATA3 は生存群で死亡群と比較して有意に増加した。これはサイトカインバランス比率の結果を支持するものである。これらの結果より、死亡群と生存群では異なる脳内免疫状態を形成する細胞の浸潤・増殖が起きていることが推察される。

CD 抗原の qRT-PCR 解析結果から、JEV 感染マウス脳内では CD3 と CD8 が非感染群の脳と比較して約 100 倍、発現量が増加していることが確認された。この結果は CD3+CD8+T 細胞が JEV 感染マウスの脳内に浸潤・増殖したことを示している。しかし、JEV 感染マウス群での比較では生存群と死亡群の間に CD3 と CD8 の発現量に有意差は認められなかったことから、生存群と死亡群の間に脳内 T 細胞に量的な差がなかったことを示唆している。同様に、IL-2 レセプターである CD25 やリンパ球活性化マーカーである CD69 の発現解析結果も、JEV 感染マウスでは非感染群と比較して有意に増加しているが、JEV 感染マウス群の比較では生存群と死亡群の間には有意差は見られなかった。これは生存群と死亡群の脳内 T 細胞活性化因子の間に発現量の差がなかったことを示している。CD4 の発現量は非感染群と JEV 感染群での差はなかった。これは中枢神経系に常在する CD4+ミクログリアに起因するものと考えられる[49,50]。炎症性サイトカインの発現は CD4+T 細胞によるところが大きいため、今回得られた結果はミクログリアによって発現された CD4 転写産物が CD4+T 細胞転写産物をマスクしてしまった可能性を考慮すべきである。

細胞障害因子関連遺伝子を測定した結果、Perforin、Gzm A、Gzm B の mRNA 発現量が生存群と比較して死亡群で有意に増加していた。これらの局所細胞障害の制御を行う Treg の評価を行うため、Treg 関連遺伝子の発現定量を行った。Treg 関連遺伝子の mRNA 発現は死亡群と比較して生存群で有意に増加したことから、局所細胞障害活性と Treg 関連遺伝子発現量が逆相関の関係を示すことが明らかとなった。フラビウイルス属に属するほかのウイルス感染症の報告として C 型肝炎ウイルスに起因する感染症において、肝生検組織内の Treg 数と組織学的炎症性のスコア間の逆の相関があることが報告されている[51]。この結果は JEV 感染性脳炎において脳内 Treg の発現量が予後因子となることを示唆している。

CD8+T 細胞がウイルス性脳炎においてウイルス排除に重要な役割を示すことが報告されている[52-55]。一方では、CD8+細胞がフラビウイルス感染症において過剰な免疫応答による免疫病理学的な病変を引き起こすことも報告されている[6]。藤井らは TBEV 感染モデルマウスを用いて感染後の予後と脳内浸潤 CD8+T 細胞の量的および質的な解析の報告を行ったが、予後と T 細胞の量的な差に相関は認められなかった[32]。

本研究においては浸潤 T 細胞の評価を行うために TCR レパトア解析を行った結果、JEV 感染マウスでは VA8-1、VA10-1、VB2-1 の発現頻度が脳内で増加していることが明らかとなった。しかし JEV 感染マウス内では生存群と死亡群間でその発現頻度には差が認められなかった。この結果は、予後にかかわらず、一定量のウイルスが脳内に浸潤した結果ウイルス特異的に選択された TCR V ファミリーを有する T 細胞が脳内に浸潤し増殖する可能性を示唆している。

同一 V ファミリー内での相違をさらに詳細に明らかにするために、CDR3 アミノ酸配列解析を行った。その結果、VA8-1 においては死亡群で個体間に共通する 4 種のクローンが確認されたが、生存群では個体間に共通するクローンは存在しなかった。VA10-1 では生存群と死亡群で、群内で個体をまたいで共通するクローンが異なった。また、1 クローンのみ生存群（#4, 3 / 15）と死亡群（#5, 1 / 15）に共通するクローンが確認された。これはどちらの群においても JEV は存在していること、また、JEV はいくつかのエピトープとなり得る部分が存在することから、生存群と死亡群のマウスの T 細胞が共通して認識をしたエピトープに対する TCR であることが考えられる。同様に 2 群間で共通するクローンは、VB2-1 の CDR3 アミノ酸配列解析においても確認されている。VB2-1 では両群に独立して個体をまたいで確認されたクローン種が同定されたが、共通するクローンも多くの個体で確認された。T 細胞の抗原認識において、 $\alpha$  鎖は 1 つのエピトープに対して厳格な反応を示すが、 $\beta$  鎖はバリエーションが存在することが報告されている。Dietrich らはヒトサンプルにおいて、MHC 拘束性に melan-A ペプチド特異的 CD8+T 細胞クローンを選択し、VA2-1 と複数の VB が存在することを示した[56]。また Messaoudi らは、ヘルペスウイルスの HSV-8p ペプチド特異的 B6.C-H-2<sup>bm8</sup> マウス由来 CTL の TCR レパトア解析において、VA2 と複数の VB の使用が確認され、各々の VB に分画後に CTL アッセイを行った結果、全ての VB 保有細胞において同様の細胞傷害性の能力があることを証明した[57]。Dong らは、ヘルペスウイルス 2 型に感染歴のあるヒトの PBMC より分離した HSV-2 VP22 エピトープに対する CD8+T 細胞クローンにおいて、VA1-1 と複数の VB が検出されたことを報告している[58]。

しかしながら、VB2-1 において生存群もしくは死亡群に優勢的に確認されたクローン型は複数存在していた。また、J 遺伝子の使用頻度解析の結果では死亡群の脳内には VA8-1 / AJ21 を持つ T 細胞が有意に多く存在していることが、生存群の脳内には VA8-1 / AJ23、VA8-1 / AJ31、VA10-1 / AJ33 および VA10-1 / AJ42 の遺伝子を持つ T 細胞が多く浸潤していた。

以上の結果より、同じハプロタイプのマウスに JEV を感染させたときには同じレベルの脳内ウイルス量および力価を示し、同じレベルの CD3+CD8+T 細胞の浸潤をもたらすが、個体により異なる T 細胞が脳内に浸潤し増殖するため、その T 細胞の分子的性状の違いにより予後が決定される可能性があることが示唆された。つまり、JEV 感染後の生存群と死亡群は異なる脳内免疫性状と脳内細胞障害活性を示していた。これらを形成していると考えられる脳内浸潤 T 細胞の量的な差や活性化度に差は認められなかったが、TCR の異なる質的に異なる T 細胞がそれぞれ脳内に浸潤・増殖していることが明らかとなった。TBEV において予後と脳内浸潤 T 細胞の関連性を解析した結果では、このような明らかなクローンの違いは認められなかった[32]。また、TBEV と異なり JEV 感染マウスにおいては生存群で個体により脳内ウイルス量に大きなばらつきが認められた。感染成立するウイルス量を接種しており、なおかつ生存群のマウスの約半数は死亡群と同程度の脳内ウイルス量を呈していることから、なぜ一部の生存群のマウスにおいて脳内ウイルス量が低かったのかについて考慮する必要がある。JEV 接種時における実際の接種量のばらつきはある程度考慮する必要があるが、むしろ、これらのマウスは末梢において JEV 感染に対してより強力な免疫応答が起こった結果と考えられる。この点に関して、TBEV 誘発性脳炎と JEV 誘発

性脳炎は病態が異なる可能性がある。ウイルス感染後の脳炎時における脳内浸潤 T 細胞に予後と関連した T 細胞のクローナリティーに違いが表れる JEV と表れない TBEV という差は、感染初期の末梢レベルでの液性免疫と細胞性免疫のバランスの差によって起きると考えられる。また、性質の違う T 細胞が JEV 感染マウスの予後を変化させている要因について、感染マウス脳内の Treg 関連遺伝子の発現レベルと JEV 特異的脳内浸潤 T 細胞クローンの間に相関性が認められるため、Treg が JEV に特異的な免疫応答と炎症を抑制または制御することによって保護作用を及ぼす可能性があると考えられる。脳内浸潤 T 細胞が JEV 感染症の予後に対して有用もしくは有害な作用をしているかを決定することは脳炎の病態解明において重要なことである。Treg による脳内免疫の抑制は、中枢神経系での近傍組織の損傷を緩和するために不可欠である可能性がある。JEV 感染後、どのような因子が Treg の脳内浸潤と活性化につながるかを決定付けているかは興味深い。今後の研究は、脳局所ではなく感染初期の末梢レベルでの免疫応答の解析と、脳内への Treg の誘導の機序を明らかにする必要がある。現在使用している T 細胞解析手法である AL-PCR と MHA 法を用いた TCR レパトア解析においては、JEV 感染マウスの脾臓から JEV 特異的な TCR を持つ T 細胞の検出はされない。これは今までに報告された WNV や TBEV を用いた T 細胞の解析結果と同様である。この解釈として考えられることは、免疫反応は脳内で最も活発に行われており、末梢免疫応答は JEV 感染性脳炎に大きな影響を及ぼさないという可能性、そしてもう一つは脾臓という大きなリンパ組織プールの中に特異的 T 細胞が存在はしているが、検出限界以下である可能性である。本研究の結果や過去の報告[16]は、末梢の免疫応答を

TCR レベルで解析する必要があることを示している。より感度を高めた TCR 解析手法として、次世代シーケンサーを用いた大規模 TCR スクリーニングを行う手法を近年確立しつつある。この手法は一般的にはゲノム解析に用いられてきた次世代シーケンサーであるが、機器・技術の発達とともに解析全長が伸び（約 350 bp）これは TCR の全長を V 領域、N 領域（ $\beta$  鎖：N-D-N 領域）、J 領域、C 領域まですべてカバーできる長さとなっている。プライマーを V 遺伝子の外側から C 遺伝子までで設計することにより、TCR リモデリングでの超可変部領域を含めた遺伝子すべてを同時にエマルジョン PCR につけ、シーケンスを行う手法である。従来の大腸菌を用いたシーケンス手法と比べるとコスト・解析時間共に大幅に削減でき、検出感度も飛躍的に高くなる。この手法は末梢中での存在頻度のマスキされた特異的 TCR の検出を行うことが期待できるものである。今後、この手法を用いた感染初期の末梢での免疫応答の個体差を、本研究で得られた脳内浸潤 JEV 特異的 TCR の情報を基に解析していく。また、それらの性状を解明することにより、予後により強く関わりのあることが示唆された TCR を明らかにし、JEV 感染における病態解明と予後予測、および新規治療法の開発に関して新しい知見を得られることが期待できる。

## 2-5. 結論

JEV S982 株を  $10^4$  pfu 皮下接種により感染させたマウスにおいて、感染後 13 日目に 25% 以上体重減少を起こしたマウスは 21 日目までに全頭死亡した（死亡群）。一方で、感染後 13 日目までに体重減少が 10% 未満であった、もしくは変化のなかった個体に死亡したマウスはいなかった（生存群）。この結果は、JEV を接種した際に同一ハプロタイプのマウスにおいても感染後異なる経過を辿ることを示している。本研究では重症度を決定する要因の解明を目的に脳内免疫学的性状の解析および脳内浸潤 T 細胞の性状解析を行った。ウイルス量及びウイルス力価の測定を行ったが、死亡群では  $10^6$  pfu/g 以上の高いウイルス量を示したのに対し、生存群では  $10^{2\sim 8}$  pfu/g の異なる脳内ウイルス量を示した。本実験においては、ウイルス量とは別の要因を解析するために、生存群より  $10^6$  pfu/g 以上の個体を選択して、死亡群との比較解析を行った。qRT-PCR を用いた CD 抗原の定量解析において、死亡群と生存群の間に浸潤 T 細胞の量的な差や活性化マーカーの発現量に差は認められなかった。しかし、Th1 型および Th2 型サイトカインの発現量を測定し、比率解析を行った結果では死亡群は生存群と比較して有意に Th1 側に偏った脳内サイトカインバランスを呈した。細胞障害関連因子の発現量においても、Perforin、Gzm A、Gzm B の発現量が生存群と比較して死亡群で有意に増加していた。制御性 T 細胞関連遺伝子の発現量については死亡群と比較して生存群で有意に増加していた。また、TCR レパトア解析において、JEV 感染マウスの脳内浸潤 T 細胞は VA8-1、VA10-1 および VB2-1 を高発現していたが、生存群と死亡群の間に発現量の差は認められなかった。しかし、CDR3 のアミノ酸配列解析では TCR AV・

BV とともに生存群と死亡群の間で優勢に発現している CDR3 クローン型が異なった。この結果は、JEV 接種後の予後の相違（死亡または生存）はそれぞれのマウス脳内に浸潤してきた独自の CDR3 アミノ酸配列の異なる T 細胞の質的な差によって形成されていることを示唆している。具体的には、生存群において Treg 関連遺伝子発現が増加していたことより、局所免疫系の Treg による制御の多寡が JEV 感染マウスの予後を決定している可能性がある。また、脳内サイトカインパターンの違いの形成にも、それら脳内浸潤 T 細胞の質的な差が関与している可能性がある。これまで JEV 誘発性脳炎において、T 細胞はウイルス排除に有用な働きをしていることは知られているが、本研究によって得られた知見は、一部の局所免疫を Treg が制御することにより免疫病理機序を抑制し、感染による病態を軽度に行っている可能性がある。また、脳内浸潤 T 細胞の解析において同じフラビウイルス属のウイルスである TBEV で得られた結果と異なることは興味深い。マウスにおいてフラビウイルス脳炎においては脳内のウイルス価のみでなく、異なる TCR を発現する T 細胞によって引き起こされる免疫学的機序の相違によっても決定される。今後、脳炎発症に至るまでの免疫学的機序の相違を末梢レベルで明らかにすることにより、より早期の末梢レベルでの予後予測や治療法開発に対しての知見が得られることが期待される。B6 マウスにおける JEV 特異的 T 細胞のクローン群は本実験において同定されているため、それらのクローン型の情報を基に今後は現在の研究手法では検出できなかった末梢における免疫レベルの免疫性状の解析を、次世代シーケンサーを用いた大規模 TCR スクリーニングにより評価することにより、さらに JEV 感染後の全身的かつ継時的な免疫性状の解明を行う予定である。



## 参考文献

1. Mackenzie JS, Gubler DJ, Petersen LR (2004) Emerging flaviviruses: the spread and resurgence of Japanese encephalitis, West Nile and dengue viruses. *Nat Med* 10: S98-109.
2. Kumar R, Mathur A, Kumar A, Sethi GD, Sharma S, et al. (1990) Virological investigations of acute encephalopathy in India. *Arch Dis Child* 65: 1227-1230.
3. 厚生労働省, 健感発第 0530001 号
4. Vince V, Grcevic N (1969) Development of morphological changes in experimental tick-borne meningoencephalitis induced in white mice by different virus doses. *J Neurol Sci* 9: 109-130.
5. Licon Luna RM, Lee E, Mullbacher A, Blanden RV, Langman R, et al. (2002) Lack of both Fas ligand and perforin protects from flavivirus-mediated encephalitis in mice. *J Virol* 76: 3202-3211.
6. Wang Y, Lobigs M, Lee E, Mullbacher A (2003) CD8<sup>+</sup> T cells mediate recovery and immunopathology in West Nile virus encephalitis. *J Virol* 77: 13323-13334.
7. Samuel MA, Diamond MS (2006) Pathogenesis of West Nile Virus infection: a balance between virulence, innate and adaptive immunity, and viral evasion. *J Virol* 80: 9349-9360.
8. King NJ, Getts DR, Getts MT, Rana S, Shrestha B, et al. (2007) Immunopathology of flavivirus infections. *Immunol Cell Biol* 85: 33-42.
9. Ruzek D, Salat J, Palus M, Gritsun TS, Gould EA, et al. (2009) CD8<sup>+</sup> T-cells mediate

immunopathology in tick-borne encephalitis. *Virology* 384: 1-6.

10. Lindsley MD, Rodriguez M (1989) Characterization of the inflammatory response in the central nervous system of mice susceptible or resistant to demyelination by Theiler's virus. *J Immunol* 142: 2677-2682.
11. Fujii Y, Kitaura K, Nakamichi K, Takasaki T, Suzuki R, et al. (2008) Accumulation of T-cells with selected T-cell receptors in the brains of Japanese encephalitis virus-infected mice. *Jpn J Infect Dis* 61: 40-48.
12. Suvas S, Kumaraguru U, Pack CD, Lee S, Rouse BT (2003) CD4+CD25+ T cells regulate virus-specific primary and memory CD8+ T cell responses. *J Exp Med* 198: 889-901.
13. Kumar V (2004) Homeostatic control of immunity by TCR peptide-specific Tregs. *J Clin Invest* 114: 1222-1226.
14. O'Garra A, Vieira P (2004) Regulatory T cells and mechanisms of immune system control. *Nat Med* 10: 801-805.
15. Sakaguchi S (2005) Naturally arising Foxp3-expressing CD25+CD4+ regulatory T cells in immunological tolerance to self and non-self. *Nat Immunol* 6: 345-352.
16. Lanteri MC, O'Brien KM, Purtha WE, Cameron MJ, Lund JM, et al. (2009) Tregs control the development of symptomatic West Nile virus infection in humans and mice. *J Clin Invest* 119: 3266-3277.
17. Diamond MS, Shrestha B, Marri A, Mahan D, Engle M (2003) B cells and antibody play critical

roles in the immediate defense of disseminated infection by West Nile encephalitis virus. *J Virol* 77: 2578-2586.

18. Tesh RB, Siirin M, Guzman H, Travassos da Rosa AP, Wu X, et al. (2005) Persistent West Nile virus infection in the golden hamster: studies on its mechanism and possible implications for other flavivirus infections. *J Infect Dis* 192: 287-295.
19. Luhn K, Simmons CP, Moran E, Dung NT, Chau TN, et al. (2007) Increased frequencies of CD4+ CD25(high) regulatory T cells in acute dengue infection. *J Exp Med* 204: 979-985.
20. Davis MM (1990) T cell receptor gene diversity and selection. *Annu Rev Biochem* 59: 475-496.
21. Ding YH, Smith KJ, Garboczi DN, Utz U, Biddison WE, et al. (1998) Two human T cell receptors bind in a similar diagonal mode to the HLA-A2/Tax peptide complex using different TCR amino acids. *Immunity* 8: 403-411.
22. Matsutani T, Ohmori T, Ogata M, Soga H, Yoshioka T, et al. (2006) Alteration of T-cell receptor repertoires during thymic T-cell development. *Scand J Immunol* 64: 53-60.
23. Gotoh A, Hamada Y, Shiobara N, Kumagai K, Seto K, et al. (2008) Skew in T cell receptor usage with polyclonal expansion in lesions of oral lichen planus without hepatitis C virus infection. *Clin Exp Immunol* 154: 192-201.
24. Horiuchi T, Hirokawa M, Kawabata Y, Kitabayashi A, Matsutani T, et al. (2001) Identification of the T cell clones expanding within both CD8(+)CD28(+) and CD8(+)CD28(-) T cell subsets in recipients of allogeneic hematopoietic cell grafts and its implication in

- post-transplant skewing of T cell receptor repertoire. Bone Marrow Transplant 27: 731-739.
25. Matsutani T, Shiiba K, Yoshioka T, Tsuruta Y, Suzuki R, et al. (2004) Evidence for existence of oligoclonal tumor-infiltrating lymphocytes and predominant production of T helper 1/T cytotoxic 1 type cytokines in gastric and colorectal tumors. Int J Oncol 25: 133-141.
  26. Shiobara N, Suzuki Y, Aoki H, Gotoh A, Fujii Y, et al. (2007) Bacterial superantigens and T cell receptor beta-chain-bearing T cells in the immunopathogenesis of ulcerative colitis. Clin Exp Immunol 150: 13-21.
  27. Fujisaki Y, Miura Y, Sugimori T, Murakami Y, Miura K (1983) Experimental studies on vertical infection of mice with Japanese encephalitis virus. IV. Effect of virus strain on placental and fetal infection. Natl Inst Anim Health Q (Tokyo) 23: 21-26.
  28. 松尾 幸子, 森田 公一, 森田 (分籐) 桂子, 五十嵐 章 (1994) 近交系マウス間における日本脳炎ウイルス末梢接種による感受性の差異. ウイルス 44(2), 205-215.
  29. Hayasaka D, Shirai K, Aoki K, Nagata N, Simantini DS, et al. (2013) TNF-alpha acts as an immunoregulator in the mouse brain by reducing the incidence of severe disease following Japanese encephalitis virus infection. PLoS One 8: e71643.
  30. Kasahara T, Miyazaki T, Nitta H, Ono A, Miyagishima T, et al. (2006) Evaluation of methods for duration of preservation of RNA quality in rat liver used for transcriptome analysis. J Toxicol Sci 31: 509-519.
  31. Hayasaka D, Nagata N, Fujii Y, Hasegawa H, Sata T, et al. (2009) Mortality following

peripheral infection with tick-borne encephalitis virus results from a combination of central nervous system pathology, systemic inflammatory and stress responses. *Virology* 390: 139-150.

32. Fujii Y, Hayasaka D, Kitaura K, Takasaki T, Suzuki R, et al. (2011) T-cell clones expressing different T-cell receptors accumulate in the brains of dying and surviving mice after peripheral infection with far eastern strain of tick-borne encephalitis virus. *Viral Immunol* 24: 291-302.
33. Szabo SJ, Kim ST, Costa GL, Zhang X, Fathman CG, et al. (2000) A novel transcription factor, T-bet, directs Th1 lineage commitment. *Cell* 100: 655-669.
34. Neurath MF, Weigmann B, Finotto S, Glickman J, Nieuwenhuis E, et al. (2002) The transcription factor T-bet regulates mucosal T cell activation in experimental colitis and Crohn's disease. *J Exp Med* 195: 1129-1143.
35. Robinson DS, Lloyd CM (2002) Asthma: T-bet--a master controller? *Curr Biol* 12: R322-324.
36. Zhang DH, Cohn L, Ray P, Bottomly K, Ray A (1997) Transcription factor GATA-3 is differentially expressed in murine Th1 and Th2 cells and controls Th2-specific expression of the interleukin-5 gene. *J Biol Chem* 272: 21597-21603.
37. Farrar JD, Ouyang W, Lohning M, Assenmacher M, Radbruch A, et al. (2001) An instructive component in T helper cell type 2 (Th2) development mediated by GATA-3. *J Exp Med* 193: 643-650.

38. Kishikawa H, Sun J, Choi A, Miaw SC, Ho IC (2001) The cell type-specific expression of the murine IL-13 gene is regulated by GATA-3. *J Immunol* 167: 4414-4420.
39. Marie JC, Letterio JJ, Gavin M, Rudensky AY (2005) TGF-beta1 maintains suppressor function and Foxp3 expression in CD4+CD25+ regulatory T cells. *J Exp Med* 201: 1061-1067.
40. Brunkow ME, Jeffery EW, Hjerrild KA, Paepers B, Clark LB, et al. (2001) Disruption of a new forkhead/winged-helix protein, scurf, results in the fatal lymphoproliferative disorder of the scurfy mouse. *Nat Genet* 27: 68-73.
41. Fontenot JD, Gavin MA, Rudensky AY (2003) Foxp3 programs the development and function of CD4+CD25+ regulatory T cells. *Nat Immunol* 4: 330-336.
42. Hori S, Nomura T, Sakaguchi S (2003) Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3. *Science* 299: 1057-1061.
43. Khattri R, Cox T, Yasayko SA, Ramsdell F (2003) An essential role for Scurfin in CD4+CD25+ T regulatory cells. *Nat Immunol* 4: 337-342.
44. Tsuruta Y, Iwagami S, Furue S, Teraoka H, Yoshida T, et al. (1993) Detection of human T cell receptor cDNAs (alpha, beta, gamma and delta) by ligation of a universal adaptor to variable region. *J Immunol Methods* 161: 7-21.
45. Matsutani T, Yoshioka T, Tsuruta Y, Iwagami S, Suzuki R (1997) Analysis of TCRAV and TCRBV repertoires in healthy individuals by microplate hybridization assay. *Hum Immunol* 56: 57-69.

46. Matsutani T, Yoshioka T, Tsuruta Y, Iwagami S, Toyosaki-Maeda T, et al. (2000) Quantitative analysis of the usage of human T-cell receptor alpha and beta chain variable regions by reverse dot-blot hybridization. *Methods Mol Biol* 134: 81-101.
47. Yoshida R, Yoshioka T, Yamane S, Matsutani T, Toyosaki-Maeda T, et al. (2000) A new method for quantitative analysis of the mouse T-cell receptor V region repertoires: comparison of repertoires among strains. *Immunogenetics* 52: 35-45.
48. Chiba N, Iwasaki T, Mizutani T, Kariwa H, Kurata T, et al. (1999) Pathogenicity of tick-borne encephalitis virus isolated in Hokkaido, Japan in mouse model. *Vaccine* 17: 779-787.
49. Omri B, Crisanti P, Alliot F, Marty MC, Rutin J, et al. (1994) CD4 expression in neurons of the central nervous system. *Int Immunol* 6: 377-385.
50. Alliot F, Marty MC, Cambier D, Pessac B (1996) A spontaneously immortalized mouse microglial cell line expressing CD4. *Brain Res Dev Brain Res* 95: 140-143.
51. Cabrera R, Tu Z, Xu Y, Firpi RJ, Rosen HR, et al. (2004) An immunomodulatory role for CD4(+)CD25(+) regulatory T lymphocytes in hepatitis C virus infection. *Hepatology* 40: 1062-1071.
52. Murali-Krishna K, Ravi V, Manjunath R (1994) Cytotoxic T lymphocytes raised against Japanese encephalitis virus: effector cell phenotype, target specificity and in vitro virus clearance. *J Gen Virol* 75 ( Pt 4): 799-807.
53. Takada K, Masaki H, Konishi E, Takahashi M, Kurane I (2000) Definition of an epitope on

Japanese encephalitis virus (JEV) envelope protein recognized by JEV-specific murine CD8+ cytotoxic T lymphocytes. Arch Virol 145: 523-534.

54. Shrestha B, Diamond MS (2004) Role of CD8+ T cells in control of West Nile virus infection. J Virol 78: 8312-8321.

55. Biswas SM, Ayachit VM, Sapkal GN, Mahamuni SA, Gore MM (2009) Japanese encephalitis virus produces a CD4+ Th2 response and associated immunoprotection in an adoptive-transfer murine model. J Gen Virol 90: 818-826.

56. Dietrich PY, Le Gal FA, Dutoit V, Pittet MJ, Trautman L, et al. (2003) Prevalent role of TCR alpha-chain in the selection of the preimmune repertoire specific for a human tumor-associated self-antigen. J Immunol 170: 5103-5109.

57. Messaoudi I, LeMaoult J, Metzner BM, Miley MJ, Fremont DH, et al. (2001) Functional evidence that conserved TCR CDR alpha 3 loop docking governs the cross-recognition of closely related peptide: class I complexes. J Immunol 167: 836-843.

58. Dong L, Li P, Oenema T, McClurkan CL, Koelle DM (2010) Public TCR use by herpes simplex virus-2-specific human CD8 CTLs. J Immunol 184: 3063-3071.



## 謝辞

本論文を終えるに当たり、終始懇切なる御指導御鞭撻を賜りました恩師である筑波大学大学院 人間総合科学研究科 教授（国立感染症研究所 副所長）倉根一郎 先生に心より感謝を申し上げます。

本研究の遂行に際しまして、熱心な御指導なご指導をいただいた独立行政法人 国立病院機構 相模原病院 臨床研究センター 診断・治療研究室 室長 鈴木隆二 先生に心より深謝致します。また、悩むことも多い研究生生活を、暑い日も寒い日も室員と共に楽しく研究を行えたのは幸せの極みでした。同研究室員である藤井克樹 先生、北浦一孝 先生、熊谷賢一 先生、小林浩 先生、江口貴紀 先生・重松宏昭 先生・宮田幸長 先生、長岡朋子 先生に心から感謝致します。

併せまして、多大なる御援助を賜りました国立感染症研究所 ウイルス第一部第2室 室長 高崎智彦 先生、第4室 室長 林昌宏 先生に心から感謝致します。また、JEV 感染サンプルを提供して頂きました長崎大学 熱帯医学研究所 教授 森田公一 先生 および 助教 早坂大輔 先生に心より感謝致します。

また、日本大学 生物資源科学部 獣医学科 生理学研究室 教授 金山喜一 先生には大学入学時からの精力的なご指導と、大学院への進学のご支持とご助言を賜りました。自らの現状に至るまでの多大なるご尽力に深い感謝を申し上げます。

最後に、生活面および精神面において支えて下さいました両親、父 白井義明、母 白井邦子、並びに妻 瑛子と、乳児ながらに私を支えてくれた娘 香蓮に深く感謝致します。

2014 年 6 月 白井 顕治